

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sistemática y filogeografía de *Dendropsophus parviceps* (Anura: Hylidae) en la Cuenca
Amazónica

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

CARLOS DANIEL RIVADENEIRA MONTENEGRO

Quito, 2014

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Carlos Daniel Rivadeneira Montenegro ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentado para la calificación correspondiente.

Dr. Santiago R. Ron

Director de la Disertación

Quito, 2014

He visitado lugares
que no pueden verse aún
me he acercado a la luna
con pasión enfermiza
oh que gran confusión
ya no estoy más aquí.

Franco Aguirre

A Carlos y a Silvia, mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Santiago Ron, director de la disertación, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto, por la confianza, por las enseñanzas y consejos brindados durante todo este estudio.

Al Dr. Omar Torres por sus valiosos consejos y al Dr. Andrés Merino por el aporte y tiempo proporcionado en mi tesis. Un agradecimiento especial a Pablo Venegas del Centro de Ornitología y Biodiversidad (CORBIDI, Lima, Perú) por el préstamo de tejidos y por los datos bioacústicos.

A la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) bajo el proyecto “Inventario y caracterización genética y morfológica de la diversidad de reptiles, aves y anfibios de los Andes del Ecuador” en el marco de la iniciativa Arca de Noé. Esta investigación también se benefició de fondos de proyectos de la Dirección General Académica de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

A la Dra. María Eugenia Ordoñez, Diana Flores y Andrea Manzano por sus enseñanzas en el Laboratorio de Biología Molecular. Al Museo de Zoología (QCAZ) especialmente a las personas que colaboraron conmigo en este estudio con sus comentarios, sugerencias, enseñanzas y asistencia en el campo: Teresa Camacho, Daniela Pareja, Marcel Caminer, Diana Pazmiño, Diana Troya, Paulina Santiana, Paloma Lima, Damián Nicolalde, Francy Mora, Daniel Escobar, Diego Paucar, Fernando Ayala, Ítalo Tapia, Eduardo Toral, Mario Yáñez, Gabriela Barragán, Sebastián Dávalos y Melissa Rodríguez.

Un agradecimiento muy especial a mis padres por todo su apoyo incondicional y cariño, a mi hermana, a todos mis amigos por su sincera amistad y a todas las personas que son parte de mi historia.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. MECANISMOS DE DIVERSIFICACIÓN	5
3.1.1. ROL DE LAS BARRERAS FLUVIALES	5
3.1.2. ROL DE GRADIENTES	7
3.1.3. ROL DE LA SELECCIÓN SEXUAL	9
3.2. PATRONES DE DIVERSIFICACION	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. ESPECIE BAJO ESTUDIO.....	11
4.2. MUESTREOS POBLACIONALES.....	12
4.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN	13
4.4. ENSAMBLE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE ADN..	14
4.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	14
4.5.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA	15
4.5.2. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	16
4.6. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS	16
4.7. RED DE HAPLOTIPOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA.....	17
4.8. TESTS DE HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS.....	18
4.9. ANÁLISIS BIOACÚSTICOS	19
4.10. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	20
4.11. ANÁLISIS INTEGRATIVO Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES.....	21

5. RESULTADOS.....	23
5.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	23
5.1.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y MÁXIMA VEROSIMILITUD	23
5.2. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS	25
5.3. RED DE HAPLOTIPOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA.....	26
5.4. TESTS DE HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS.....	26
5.5. ANÁLISIS BIOACÚSTICOS	27
5.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS	29
6. DISCUSIÓN.....	30
6.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN <i>Dendropsophus parviceps</i>	30
6.2. BIOGEOGRAFÍA Y RELACIONES FILOGEOGRÁFICAS DENTRO DE <i>Dendropsophus parviceps</i>	32
6.3. PRUEBA DE HIPÓTESIS DE MECANISMOS DE DIVERSIFICACIÓN	35
6.4. ENFOQUE INTEGRATIVO Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES	38
7. LITERATURA CITADA	42

1. RESUMEN

Varias hipótesis han sido planteadas para dilucidar los procesos evolutivos y biogeográficos que han generado la alta riqueza de especies en la región Neotropical. En este estudio se utilizó como modelo a *Dendropsophus parviceps*, un hílido ampliamente distribuido en la Amazonía, para explorar la diferenciación genética entre sus poblaciones y sus mecanismos de especiación. Se combinaron 3089 pb de ADN de genes mitocondriales (12S, ND1 y CO1) de 122 individuos de 50 poblaciones de la Amazonía ecuatoriana y peruana. En la filogenia se encontró cuatro clados con alto soporte: el clado Pastaza con poblaciones de la Cuenca del Pastaza, el clado Napo con poblaciones de la Cuenca del Napo, el clado Morona-Santiago con poblaciones de las cuencas del Morona y del Santiago, y el clado Perú con poblaciones de Perú. Se probaron cinco hipótesis biogeográficas con la prueba de bootstrap paramétrico: (1) la hipótesis de barreras fluviales en bancos opuestos del Río Napo; (2) la hipótesis de los límites entre grupos genéticos corresponden a los límites entre cuencas hidrográficas; (3) la hipótesis de gradientes ambientales asumiendo la monofilia de zonas altitudinales bajas y altas; (4) la hipótesis de gradientes ambientales en la Cuenca del Napo; y (5) la hipótesis de gradientes ambientales en la Cuenca del Pastaza. Por otro lado, para identificar posibles barreras del flujo génico, se utilizó el algoritmo de máxima diferencia de Monmonier implementado por el programa Barrier 2.2. También se realizó la prueba de Mantel para probar el efecto de las distancias topográficas en las distancias genéticas.

Los resultados del bootstrap paramétrico no mostraron apoyo para la hipótesis de barreras fluviales, ni para la hipótesis de gradientes ambientales en zonas bajas y altas pero dieron soporte a las hipótesis de cuencas hidrográficas y de gradientes ambientales para las

cuencas del Napo y del Pastaza. El análisis de barreras del flujo génico mostró que la barrera más importante separa las poblaciones de Ecuador de las de Perú. Las barreras subsecuentes están en Ecuador y coinciden con los límites de las cuencas hidrográficas. Pruebas de Mantel mostraron un efecto de aislamiento por distancia con una fuerte correlación entre distancias genéticas y distancias topográficas.

Un análisis integrativo con datos genéticos, bioacústicos y morfológicos reveló la presencia de una especie candidata en el clado Perú. Este clado tiene una divergencia genética para el gen 12S del 6% con respecto a los clados de Ecuador. Además, la alta diferenciación en frecuencia dominante entre los cantos de las poblaciones de Ecuador y Perú sugiere aislamiento reproductivo precigótico. En conclusión, mis resultados sugieren que los mecanismos que han influenciado en la diversificación de linajes y su estructura genética han sido las cuencas hidrográficas, los gradientes ambientales, el aislamiento por distancia y el aislamiento reproductivo precigótico.

Palabras clave: especiación, mecanismos de diversificación, distancias genéticas, diversidad críptica, especies candidatas.

2. ABSTRACT

Many hypotheses have been set out to explain the evolutionary and biogeographic processes that are responsible for the high species richness in the Neotropical region. In this study, *Dendropsophus parviceps*, a treefrog widely distributed in the Amazon basin, was used as a model to explore the genetic differentiation between its populations and its speciation mechanisms. In this study, 3089 bp of DNA of mitochondrial genes (12S, ND1 and COI) from 122 individuals and 50 populations from the Ecuadorian and Peruvian Amazon were combined. The phylogeny shows four clades with high support: the Pastaza clade includes populations of the Pastaza Basin, the Napo clade consists of populations from the Napo Basin, the Morona-Santiago clade contains populations from the Morona and the Santiago Basins, and finally the Peru clade which consists of populations from Peru. Five biogeographic hypotheses were tested with parametric bootstrapping tests: (1) riverine barrier hypothesis at opposite sides of the Napo River; (2) limits between genetic groups correspond to limits between the hydrographic basins; (3) the environmental gradients hypothesis assuming the monophyly of lowlands and highlands; (4) environmental gradients hypothesis within the Napo Basin; and (5) the environmental gradients hypothesis within the Pastaza Basin. On the other hand, possible barriers to gene flow were identified using Monmonier's maximum difference algorithm implemented by Barrier 2.2. Besides, Mantel test was conducted to test the effect of topographic distances over genetic distances.

Parametric bootstrapping results did not support the riverine barrier hypothesis and the environmental gradients hypothesis of lowlands and highlands. However, these results supported the hydrographic basins hypothesis and the environmental gradients hypothesis

of lowlands and highlands within the Napo Basin and the Pastaza Basin. The gene flow barrier analyses showed that the most important barrier separates the populations from Ecuador from the ones in Peru. The other barriers are in Ecuador and correspond with the hydrographic basins boundaries. There was a strong correlation between the genetic and the topographic distances of *D. parviceps*.

An integrative analysis with genetic, acoustic and morphological data was performed to discover cryptic species. This analysis revealed the presence of one candidate species for the Peru clade. This clade has a genetic divergence of 6% for 12S in relation to the Ecuadorian clades. Also, the difference of the dominant frequency between the bioacoustic calls of the populations of Ecuador and Peru suggest prezygotic reproductive isolation. In conclusion, the mechanisms that have influenced the diversification of lineages and their genetic structure are hydrographic basins, environmental gradients, isolation by distance and prezygotic reproductive isolation.

Keywords: speciation, diversification mechanisms, genetic distances, cryptic diversity, candidate species.

3. INTRODUCCIÓN

Hylidae es una de las familias más diversas de anfibios con 51 géneros y 945 especies actualmente reconocidas (AmphibiaWeb, 2014; Wiens *et al.*, 2010). La gran mayoría de géneros y especies de hílidos están presentes en el Neotrópico (Wiens *et al.*, 2010), el cual alberga la mayor riqueza de especies de anfibios en el mundo (Bass *et al.*, 2010; Duellman, 1999; Fouquet *et al.*, 2007b; Jansen *et al.*, 2011; Symula *et al.*, 2003).

La megadiversidad de hílidos en la región Neotropical se explica por la acumulación de especies en múltiples clados simpátricos desde el Cretácico. La explicación para este patrón de riqueza es el efecto del tiempo para la especiación que predice que un determinado grupo será especioso en la región o hábitat donde ha estado presente y se ha especiado por más tiempo (Wiens *et al.*, 2011).

Los factores que influyen directamente en la riqueza de especies son los procesos macroevolutivos de especiación, extinción y dispersión (Brown y Lomolino, 1998; Wiens *et al.*, 2006; Wiens, 2007; Wiens *et al.*, 2011). Los mecanismos potenciales de diversificación de las especies incluyen barreras geográficas, selección sexual, selección ecológica y deriva génica (Funk *et al.*, 2009).

3.1. MECANISMOS DE DIVERSIFICACIÓN

3.1.1. ROL DE LAS BARRERAS FLUVIALES

Una de las hipótesis para explicar la alta diversidad de especies en la región amazónica es la de las barreras fluviales (Wallace, 1852). La hipótesis plantea que los grandes ríos de la Amazonía delimitan la distribución geográfica de las especies restringiendo el flujo génico y permitiendo que las poblaciones de cada lado del río se diferencien a través de selección y deriva génica (Gehring *et al.*, 2012; Fouquet *et al.*, 2012a; Funk *et al.*, 2007; Funk *et al.*, 2009; Symula *et al.*, 2003; Wallace, 1852). Wallace (1852) fue el primero en plantear esta hipótesis al discutir la distribución de monos en la Amazonía (Colwell, 2000; Loughheed *et al.*, 1999). Algunos estudios en aves apoyan el efecto de las barreras fluviales (Cheviron *et al.*, 2005; Hayes y Sewlal, 2004; Höglund y Shorey, 2004). Los grandes ríos podrían afectar a la mayoría de anfibios debido a su baja vagilidad y a que son altamente filopátricos ocasionando diferenciación entre poblaciones y regiones (Fouquet *et al.*, 2007a; Fouquet *et al.*, 2012a; Loughheed *et al.*, 2006). Algunos estudios filogeográficos en anfibios de la Amazonía han encontrado soporte para esta hipótesis. Por ejemplo, Fouquet *et al.* (2012a) demostraron que poblaciones de *Adenomera andreae* están altamente diferenciadas de poblaciones vecinas en lados opuestos del Río Approuague, ubicado en la costa de la Guayana Francesa, especialmente en partes bajas donde el río alcanza su mayor amplitud. Simões *et al.* (2008) muestran que la cabecera del Río Madeira en lo alto de la Amazonía Central limita a poblaciones de *Allobates femoralis*. Los resultados de Kaefer *et al.* (2012) apoyan la existencia de clados recíprocamente monofiléticos de *Allobates nidicola* y *A. masniger* en lados opuestos de las partes bajas del Río Madeira en la Amazonía Central.

En contraste, otros estudios en anfibios no apoyan el efecto de las barreras fluviales (Gascon *et al.*, 1996; Gascon *et al.*, 1998; Gascon *et al.*, 2000; Funk *et al.*, 2007; Loughheed *et al.*, 1999). Gascon *et al.* (1998) rechazaron la hipótesis en cuatro especies de ranas de la

Amazonía (*Engystomops petersi*, *Allobates femoralis*, *Scarthyla ostinodactyla*, *Scinax rubra*). El estudio demostró que el Río Juruá no juega ningún rol en promover la diferenciación entre poblaciones. De igual manera Gascon *et al.* (2000) encontraron poco soporte en el rol de las barreras fluviales como explicación de la diversificación de anfibios.

La efectividad de los ríos como barreras va a depender de la capacidad de dispersión de las especies. En anfibios las características de historia de vida, tal como tamaño corporal, territorialidad y modo reproductivo pueden promover y mantener altos niveles de estructura genética (Fouquet *et al.*, 2012a; Kaefer *et al.*, 2012). Los modos reproductivos de muchas especies de hílidos pueden facilitar la dispersión a través de las barreras fluviales debido a que se reproducen en grandes lagos, pozas y a menudo en áreas disturbadas (Funk *et al.*, 2009).

3.1.2. ROL DE GRADIENTES

Otra hipótesis para entender el origen de la diversidad en la Amazonía está asociada a gradientes ambientales. Esta hipótesis está involucrada con gradientes altitudinales y predice especiación parapátrica debido a selección divergente a lo largo de gradientes ambientales inclinados, a pesar del continuo flujo génico y en ausencia de barreras geográficas (Antonelli *et al.*, 2010; Haffer, 1997; Moritz, 2000). La selección divergente es manejada por fuertes fuerzas ecológicas reduciendo la aptitud de híbridos, y eventualmente reduciendo el flujo génico y permitiendo la especiación (Antonelli *et al.*, 2010). Varios estudios han puesto a prueba esta hipótesis como por ejemplo Ogden y Thorpe (2002) quienes demostraron la reducción de flujo génico en diferentes tipos de hábitats a lo largo

de un gradiente ecológico en lagartijas de las Antillas. Smith *et al.* (2000) encontraron divergencia morfológica en aves de África Central a través de diferentes gradientes ecológicos. Ron *et al.* (2013a) sugieren que la diversificación del grupo de especies *Phyllomedusa perinesos* en hábitats montanos se dio por especiación parapátrica a lo largo de gradientes ambientales. En contraste, otros estudios rechazan esta hipótesis como el estudio de Funk *et al.* (2007) donde no encontraron correlación entre gradientes ambientales y divergencia genética en *Engystomops petersi*. En Roberts *et al.* (2006) apoyan el modelo de vicarianza en anfibios del género *Ameerega* debido a que encontraron especies hermanas en la misma elevación rechazando la hipótesis de gradientes ambientales.

En la Amazonía, el levantamiento de los Andes en el Neogeno (Mioceno a Holoceno) influenció la diversificación de organismos, entre ellos los anuros (Antonelli *et al.*, 2009; Antonelli *et al.*, 2010, Ribas *et al.*, 2012). Hoorn *et al.* (2010) reportan que el primer levantamiento de los Andes fue en el Oligoceno tardío-Mioceno temprano, coincidiendo con el origen de la mayoría de especies actuales de anfibios de la Amazonía que se estima que ocurrió durante el Mioceno tardío con estimados que alcanzan el Oligoceno tardío (Kaefer *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2009). Por lo tanto, la reciente formación de las montañas ocasionó una rápida diversificación como resultado de gradientes ecológicos, dispersión hacia nuevos hábitats y ausencia de competencia (Guarnizo *et al.*, 2009). El ejemplo más notable es el estudio de Graham *et al.* (2004) donde muestran una correlación entre gradientes ambientales y divergencia adaptativa en dendrobátidos en la Cordillera Occidental ecuatoriana. Lynch y Duellman (1997) sugieren que la compleja topografía de los Andes y la historia climática han tenido un profundo impacto en la distribución y especiación en varias especies de *Pristimantis*.

3.1.3. ROL DE LA SELECCIÓN SEXUAL

Otro mecanismo que podría influir en la diversificación es el aislamiento comportamental que evoluciona cuando las señales de cortejo del macho y las preferencias de la hembra por estas señales divergen entre poblaciones, tanto que las hembras prefieren la señal local del macho. Este mecanismo puede incluir la selección sexual, selección ecológica divergente o deriva génica (Funk *et al.*, 2009). La selección sexual puede permitir la rápida divergencia de rasgos involucrados en el sistema de reconocimiento de especies y así generar aislamiento reproductivo precigótico entre linajes, permitiendo la especiación (Boul *et al.*, 2007; Pröhl *et al.*, 2006).

3.2. PATRONES DE DIVERSIFICACION

Para explicar los patrones que generan la riqueza local, la diversificación y los rasgos evolutivos de anfibios en la Amazonía Wiens *et al.* (2011) utilizaron a Hylidae como un sistema modelo. En el estudio combinaron datos a gran escala (362 especies) con datos de riqueza local, clima y tamaño corporal. Los resultados del estudio sugieren que la diversidad de hílidos es ocasionada por el efecto del tiempo para la especiación. Sin embargo este estudio tiene sus limitaciones puesto que no explica qué mecanismos han generado la diversificación de hílidos a través del tiempo. Además, por su escala no toma los procesos de divergencia que se dan a nivel poblacional entre especies incipientes y de origen reciente. Análisis detallados a nivel de especie pueden ser mucho más informativos para entender los mecanismos que han generado la diversidad amazónica.

La morfología en anfibios es altamente conservada y a menudo es homoplásica (Fouquet *et al.*, 2012b) por lo que frecuentemente especies cercanamente relacionadas son

morfológicamente similares y clasificadas erróneamente bajo el nombre de una sola especie (Funk *et al.*, 2011). Por este motivo es probable que la diversidad amazónica esté subestimada, por lo que se requiere una revisión sistemática integrada por datos morfológicos, bioacústicos y moleculares (Fouquet *et al.*, 2007b) para entender los patrones geográficos de diversidad regional (Funk *et al.*, 2011; Vieites *et al.*, 2009).

En el presente estudio, se analizan los patrones de variación genética, morfológica y bioacústica de la rana amazónica *Dendropsophus parviceps* para explorar los procesos evolutivos y biogeográficos que han determinado la estructura genética de sus poblaciones.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ESPECIE BAJO ESTUDIO

La especie estudiada es *Dendropsophus parviceps* (Boulenger, 1882), un hílido amazónico miembro del grupo de especies *D. parviceps*. El grupo *D. parviceps* está diagnosticado por 27 transformaciones en genes nucleares y mitocondriales (Faivovich *et al.*, 2005). Este grupo contiene 11 especies que ocurren en la Amazonía: *D. allenorum* (Duellman y Trueb, 1989); *D. bokermanni* (Goin, 1960); *D. brevifrons* (Duellman y Crump, 1974); *D. frosti* (Motta *et al.*, 2012); *D. grandisonae* (Goin, 1966); *D. koechlini* (Duellman y Trueb, 1989); *D. luteoocellatus* (Roux, 1927); *D. parviceps* (Boulenger, 1882); *D. pauiniensis* (Heyer, 1977); *D. schubarti* (Bokermann, 1963) y *D. timbeba* (Martins y Cardoso, 1987). Varios estudios encuentran a este grupo polifilético (Motta *et al.*, 2012; Fouquet *et al.*, 2011; Pyron y Wiens, 2011; Wiens *et al.*, 2010), dado que fallan al intentar relacionar *D. allenorum*, *D. schubarti* y *D. giesleri* con *D. koechlini*, *D. frosti*, *D. brevifrons*, y *D. parviceps*.

Dendropsophus parviceps (Boulenger, 1882) se encuentra ampliamente distribuido en la Cuenca Amazónica de Brasil, Venezuela (Guaiquinima-tepui, Amazonas y Caño Surumoni, Bolívar), Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Frost, 2013). En Ecuador está presente en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Tungurahua, Pastaza y Morona-Santiago. Su rango altitudinal va desde 100 hasta los 1600 msnm (Ron y Read, 2012). La localidad tipo de *D. parviceps* es Sarayaku en la provincia de Pastaza. Debido a su amplia distribución y a su gradiente altitudinal *D. parviceps* representa un excelente modelo para

entender los procesos que generan divergencia genética y en última instancia, especiación y extinción en la Amazonía.

Dendropsophus parviceps es una pequeña rana con un hocico corto y truncado. En machos y hembras el anillo timpánico es visible. El dorso es liso con pequeños tubérculos dispersos y el vientre es granular. El dorso es de color bronce con una franja alargada cuadrangular que empieza en el párpado superior y se extiende hasta la región sacral. Poseen una barra suborbital crema. La superficie ventral es gris con una mancha de color naranja en la pantorrilla y en la axila. Los machos carecen de excrecencias nupciales. Hay un gran dimorfismo sexual en el tamaño. La longitud rostro-cloacal en machos es 18 mm y en hembras 26 mm (Boulenger, 1882; Duellman, 1978; Duellman, 2005; Duellman y Crump, 1974; Ron y Read, 2012).

Estas ranas son comunes en bosque primario o secundario, donde se congregan en pantanos para reproducirse. El macho canta desde las hojas de la vegetación emergente entre 1 y 5 m sobre la superficie del agua (Duellman y Crump, 1974; Ron y Read, 2012).

4.2. MUESTREOS POBLACIONALES

Los especímenes y tejidos de *Dendropsophus parviceps* fueron obtenidos de la colección del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y del Centro de Ornitología y Biodiversidad (CORBIDI, Lima, Perú). Adicionalmente, se realizaron salidas de campo para muestrear poblaciones de *D. parviceps* en las localidades de: Yasuní (Orellana); Río Verde (Tungurahua); Río Negro (Tungurahua); Sarayaku (Pastaza); Canelos (Pastaza); Santiago (Morona Santiago); Puerto

Morona (Morona Santiago) y Archidona (Napo). Se tomaron muestras de tejido (hígado y músculo) que fueron conservadas en etanol al 95%. Los especímenes fueron fijados en formol al 10% y preservados en etanol al 75%. Estos especímenes y tejidos forman parte de la colección del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ). En total se analizaron 50 localidades de la Amazonía ecuatoriana y peruana de poblaciones de *D. parviceps* (Figura 1, Figura 2, Anexo 1).

4.3. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN

El ADN fue extraído de tejidos (hígado y músculo) preservados en etanol al 95%. Se utilizó el protocolo de Tiocianato-Guanidina de M. Fujita con modificaciones realizadas por M. Ordóñez en el Laboratorio de Biología Molecular de la división de Herpetología del QCAZ (Anexo 2).

Se amplificó los genes mitocondriales 12S rRNA, ND1 (con los genes adyacentes de tRNA (tRNA-Leu, tRNA-Ile y tRNA-Gln) y un pequeño fragmento del gen 16S rRNA) y CO1 utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las amplificaciones se realizaron con una solución de 25 µl (2.5 µl de Buffer PCR 5X, 1.5 µl de MgCl₂ 50mM, 0.5 µl de cada primer 10µM, 0.5 µl de dNTPs 10mM, 0.25 µl de polimerasa Taq, una unidad de ADN y 18.25 µl de dH₂O). Los cebadores y protocolos empleados se detallan en la Tabla 1 y Anexo 3.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% mediante electroforesis. Se purificaron las muestras amplificadas eliminando residuos de cebadores y dNTPs con el kit de purificación ExoSAP-IT (GE Healthcare). Los productos

amplificados fueron secuenciados por la empresa Macrogen (Macrogen Inc., Seúl, Corea). También se incluyeron secuencias de *Dendropsophus parviceps* disponibles en el GenBank.

Las secuencias de ADN para las especies del grupo externo se obtuvieron de la base de datos del banco de genoma del Museo de Zoología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (QCAZ) y del GenBank.

4.4. ENSAMBLE, EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE ADN

Las secuencias obtenidas se ensamblaron en el programa Geneious Pro v5.4.6 (Drummond *et al.*, 2011). El alineamiento se realizó utilizando la aplicación MAFFT Multiple Alignment v6.814b con el algoritmo L-INS-i (Katoh *et al.*, 2002). Las secuencias se importaron a Mesquite v2.75 (Maddison y Maddison, 2011) para editar manualmente regiones mal alineadas. Los loci que codifican para proteínas fueron traducidos a aminoácidos en Mesquite para ayudar a la alineación manual verificando que no existan codones de terminación en las secuencias.

4.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

En el presente estudio se analizaron las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. Para el grupo externo se incluyeron 16 especies del género *Dendropsophus*: *D. bifurcus* (4 ssp.), *D. brevifrons* (16 ssp.), *D. carnifex* (4 ssp.), *D. ebraccatus* (1 ssp.), *D. frosti* (1 ssp.), *D. koechlini* (2 ssp.), *D. leali* (1 ssp.), *D. leucophyllatus* (3 ssp.), *D. marmoratus* (4 ssp.), *D. microcephalus* (1 ssp.), *D. miyatai* (2

ssp.), *D. riveroi* (1 ssp.), *D. rhodopeplus* (8 ssp.), *D. sarayacuensis* (8 ssp.), *D. shiwiarum* (4 ssp.) y *D. triangulum* (9 ssp.). También se analizaron las relaciones filogenéticas de *D. parviceps* con su caldo hermano de las especies hermanas *D. brevifrons* y *D. frosti* basadas en Motta *et al.* (2012).

La mejor estrategia de partición para el set de datos de nucleótidos y el mejor modelo de sustitución para cada partición fueron seleccionados en el programa PartitionFinder v1.1.0 (Lanfear *et al.*, 2012). Para encontrar la mejor estrategia de partición se utilizó el algoritmo heurístico “greedy”. Este algoritmo realiza una búsqueda exhaustiva de todas las posibles estrategias de partición en cada set de datos y selecciona la mejor estrategia. Se utilizó el Criterio de Información Bayesiano (BIC) como criterio de optimalidad (Lanfear *et al.*, 2012). Nueve particiones se dieron a escoger al programa PartitionFinder: (1) 16S; (2) tRNA (tRNA-Leu, tRNA-Ile y tRNA-Gln); (3) 12S; (4) primera posición de los codones del gen ND1; (5) segunda posición de los codones del gen ND1; (6) tercera posición de los codones del gen ND1; (7) primera posición de los codones del gen CO1; (8) segunda posición de los codones del gen CO1 y (9) tercera posición de los codones del gen CO1.

4.5.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA

El análisis de Inferencia Bayesiana se realizó en el programa MrBayes v3.1.2 (Ronquist *et al.*, 2012). El análisis Bayesiano consistió de dos corridas paralelas mediante el algoritmo de la Cadena Markov Monte Carlo (MCMC) por 6×10^6 generaciones. Cada corrida tuvo cuatro cadenas (1 fría y 3 calientes) con una temperatura de 0.03 y se

muestreo cada 5000 generaciones. La mejor estrategia de partición y los modelos de sustitución fueron los seleccionados en PartitionFinder v1.1.0.

Para verificar la convergencia y la estacionalidad de las corridas se utilizó el programa Tracer v1.6 (Rambaut y Drummond, 2007). En las dos corridas combinadas se tomó en cuenta el tamaño efectivo de la muestra (ESS) > 200 y se descartó el 10% de las generaciones como *burn-in*.

4.5.2. ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El análisis de Máxima Verosimilitud se llevó a cabo en el programa Garli v.2.0 (Zwickl, 2006). La mejor estrategia de partición y los modelos de sustitución fueron los seleccionados en PartitionFinder v1.1.0. Se realizaron diez réplicas independientes de la búsqueda para obtener el mejor árbol con los mayores valores de verosimilitud. Para evaluar el soporte de cada nodo se realizó un bootstrap no paramétrico con 500 repeticiones.

4.6. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS

Las barreras geográficas e históricas propician la especiación alopátrica (Lougheed *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2006). Para identificar potenciales barreras que producen un cambio abrupto en el patrón de variación genética se utilizó el programa Barrier v2.2 (Manni *et al.*, 2004). Este programa utiliza el algoritmo de máxima diferencia de Monmonier (Monmonier, 1973), el cual sirve para identificar límites de áreas donde las diferencias entre un par de poblaciones son grandes utilizando una matriz de distancias

genéticas e información de coordenadas geográficas (Gehring *et al.*, 2012; Manni *et al.*, 2004; Newman, 2009). Las poblaciones fueron conectadas por la triangulación Delaunay (Anexo 4), un método que conecta un set de puntos adyacentes de un mapa con un set de triángulos (Manni *et al.*, 2004). La primera barrera que es identificada representa la más alta divergencia genética entre grupos de poblaciones y por lo tanto sería la principal barrera de flujo génico (Crottini *et al.*, 2012; Newman, 2009). Las distancias genéticas se calcularon en MEGA v5.2 (Tamura *et al.*, 2011) para todas las secuencias concatenadas utilizando el método de distancias *p*. Los estimados se basaron en 500 réplicas bootstrap. Las coordenadas geográficas para las localidades se muestran en el Anexo 5.

Se analizó también el efecto de las distancias topográficas en las distancias genéticas a través de una prueba de Mantel con 999 permutaciones. Para la prueba se utilizó el paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2013) en el programa R v3.0.1 (R Core Team, 2013). Las distancias genéticas se calcularon en Mesquite para todas las secuencias concatenadas. La matriz de distancias topográficas entre poblaciones fue obtenida utilizando lenguaje de programación en función del paquete SP (Pebesma *et al.*, 2005) desarrollado por A. Merino en R. La prueba de Mantel se realizó intra clados.

4.7. RED DE HAPLOTIPOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

La red de haplotipos evalúa la variación de la estructura genética dentro y entre poblaciones (Beebe y Rowe, 2008). Este análisis se utilizó para comparar la distribución espacial de los haplotipos con la distribución geográfica de las poblaciones y para inferir relaciones entre haplotipos. Se usó el programa Network v.4.6 (Bandelt *et al.*, 1999) para estimar las redes de haplotipos (genes por separado) utilizando el algoritmo Median-

Joining basado en el criterio de parsimonia. Se utilizó el programa DnaSP v5.10.01 (Rozas *et al.*, 2010) para calcular el número de haplotipos (h), la diversidad haplotípica (Dh), la diversidad nucleotídica (π) y el número de sitios polimórficos (s).

4.8. TESTS DE HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS

La prueba de bootstrap paramétrico genera simulaciones bajo la suposición de que una hipótesis nula es correcta (Huelsenbeck *et al.*, 1996, Huelsenbeck y Crandall, 1997). Bajo esta prueba se probó si existe monofilia recíproca entre haplotipos de *Dendropsophus parviceps* de lados opuestos del Río Napo (Funk *et al.*, 2007, Ron *et al.*, 2013b). Se incluyó todas las localidades a menos de 100 km al norte y al sur del Napo y a una altitud menor a 300 m. También se probó la hipótesis de que los límites entre grupos genéticos corresponden a los límites entre cuencas hidrográficas. De acuerdo con Barriga (2012) una cuenca hidrográfica es la unidad hídrica que agrupa a cuerpos de agua de un drenaje y convergen en un eje fluvial. La topografía influye en la delimitación de la cuenca hidrográfica. Se incluyó localidades de la Cuenca del Río Napo y de la Cuenca del Río Pastaza debido a que son cuencas adyacentes y a su gran número de muestras (Figura 3).

También se puso a prueba la monofilia entre poblaciones que están en zonas altitudinales bajas y altas (Figura 4). Igualmente se probó la monofilia de poblaciones de zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Napo (Figura 5) y también se probó la monofilia de poblaciones de zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Pastaza (Figura 6). Localidades a menos de 1000 m sobre el nivel del mar fueron consideradas como de zona baja y con una elevación mayor a 1000 m como de zona alta. Las hipótesis son resumidas en la Figura 7.

Para aplicar la prueba de bootstrap paramétrico: (1) se generó un árbol filogenético constreñido (criterio de máxima verosimilitud) bajo el supuesto de que la hipótesis nula es verdadera en Garli v.2.0; (2) se simuló 200 matrices bajo el modelo de evolución GTR + I + G y la topología del árbol constreñido en Mesquite v2.75; (3) para cada matriz simulada, se encontró el mejor árbol constreñido y el mejor árbol sin constreñir bajo el criterio de máxima parsimonia en PAUP* v4.0 (Swofford, 2003) y se calculó la diferencia de pasos entre los dos árboles; (4) se obtuvo una distribución nula de las diferencias de las 200 matrices en Mesquite v2.75 y (5) se obtuvo la diferencia en pasos entre las filogenias constreñida y sin constreñir obtenidas a partir de la matriz observada en Mesquite v2.75. La hipótesis nula fue rechazada si la diferencia obtenida en el paso 5 no era mayor que el 5% de las diferencias obtenidas en el paso 4 (Huelsenbeck y Crandall, 1997; Maddison, 2004; Pazmiño, 2011).

4.9. ANÁLISIS BIOACÚSTICOS

Se analizó la variación de los cantos de poblaciones de *Dendropsophus parviceps* para determinar si existen patrones que sean congruentes con la variación genética. Las grabaciones fueron realizadas en el campo utilizando un micrófono Sennheiser k6-ME67 unidireccional y una grabadora Olympus LS10. La distancia mínima del canto de la rana con el micrófono fue 0.5 a 1.5 m para garantizar una buena calidad de la grabación. Se midió la temperatura del aire con un termómetro digital cerca del lugar donde cantó la rana. También se tomó datos de fecha, hora, localidad y lugar de donde cantó el individuo. Los cantos se analizaron usando el programa RavenPro v1.3 (Bioacoustics Research Program, 2008). Los análisis de frecuencia se basaron en una transformación Fourier directa con una resolución de frecuencia de 10.8 Hz y 4096 puntos. Los cantos se

obtuvieron de las localidades de: Sarayaku (Pastaza); Canelos (Pastaza); Río Verde (Tungurahua); Santiago (Morona-Santiago); Puerto Morona (Morona-Santiago); Yasuní (Orellana) y Picota (Perú).

Se midieron las siguientes variables: (1) duración del canto (simple y compuesto); (2) frecuencia dominante del canto (simple y compuesto); (3) duración del primer componente del canto compuesto; (4) duración del clic del canto compuesto; (5) frecuencia dominante del primer componente; (6) frecuencia dominante del clic; (7) número de pulsos por nota; (8) tasa de pulsos por nota; (9) tiempo de subida de la nota; (10) tiempo de subida del clic y (11) intervalo entre el primer componente y el clic del canto compuesto. Las variables bioacústicas están descritas y definidas en la Tabla 2. Las figuras 8 y 9 muestran las características de los cantos.

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar si existen diferencias entre poblaciones y entre grupos genéticos en los cantos. También se efectuó una prueba *t* de Student para comparar los valores de los componentes principales entre diferentes poblaciones. Estos análisis se ejecutaron en JMP® 9.0.1 (SAS Institute, 2010).

4.10. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Se midieron especímenes adultos de *Dendropsophus parviceps* de la colección del Museo de Zoología QCAZ (n = 107) con un calibrador digital con precisión de 0.01 mm. Las variables morfométricas y la metodología para su medición se basaron en Duellman (1970), Motta *et al.* (2012) y Cisneros-Heredia y McDiarmid (2007). Estas fueron: (1) longitud rostro-cloacal (LRC); (2) ancho de la cabeza (AC); (3) longitud de la cabeza (LC);

(4) longitud del fémur (LF); (5) longitud de la tibia (LT) y (6) longitud del pie (LP). Cada medición se tomó tres veces para luego sacar un promedio. Todas las variables fueron convertidas en logaritmos para ajustar los datos a la normalidad. Se realizaron los siguientes análisis: Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Función Discriminante (AFD) para evaluar el grado de diferenciación entre grupos genéticos y poblaciones. Estos análisis fueron aplicados en cada sexo por separado. Para eliminar el efecto de LRC, a los análisis de ACP se aplicaron los residuales de cada variable obtenidos de regresiones lineales entre las cinco variables y la LRC. Además, sólo componentes con eigenvalues > 1 fueron considerados para el ACP. También se realizó un Análisis Multivariado de Variancia (MANOVA) para probar diferencias morfométricas entre sexos. Todos los análisis fueron llevados a cabo en JMP.

4.11. ANÁLISIS INTEGRATIVO Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES

La delimitación de especies se basó en el concepto de especie de de Queiroz (2007), que define a las especies como segmentos de linajes que evolucionan independientemente, en donde los linajes llegan a ser diferentes uno del otro a través del tiempo por la adquisición de diferentes propiedades (morfológicamente diferentes, reproductivamente incompatibles, ecológicamente divergentes, monofiléticamente recíprocos, etc.). Se realizó un análisis integrativo considerando múltiples líneas de evidencia para evaluar la separación de linajes. Este análisis fue propuesto por Dayrat (2005) que acepta implícitamente el concepto evolutivo de especie propuesto por de Queiroz (2007).

La clasificación de linajes evolutivos independientes fue definida siguiendo las categorías propuestas por Vieites *et al.* (2009). Especies candidatas confirmadas (ECC) son aquellas que difieren claramente por caracteres morfológicos y acústicos, y muestran una alta diferenciación genética. Especies candidatas no confirmadas (ECNC) son aquellas con linajes genealógicos profundos, pero sin mucha información de otros caracteres.

Las distancias genéticas para el gen 12S se calcularon en Mesquite como distancias p no corregidas. El umbral para identificar posibles linajes o especies candidatas en 12S fue $> 3\%$ (Fouquet *et al.*, 2007b; Vences *et al.*, 2005a; Vences *et al.*, 2005b).

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

El alineamiento total de secuencias de ADN concatenadas fue de ~3089 pb (~937 pb de 12S, ~285 pb de 16S, ~216 pb de tRNA (tRNA-Leu, tRNA-Ile y tRNA-Gln), ~960 pb de ND1 y ~695 pb de CO1) obtenidas de 191 individuos. Sesenta y nueve individuos son del grupo externo y 122 son de *Dendropsophus parviceps*. Los resultados de PartitionFinder muestran siete particiones como mejor estrategia de partición con sus respectivos modelos de evolución seleccionados (Tabla 3).

5.1.1. ANÁLISIS DE INFERENCIA BAYESIANA Y MÁXIMA VEROSIMILITUD

Los análisis de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud produjeron árboles con similar topología por lo cual sólo se muestra el árbol de Inferencia Bayesiana con sus correspondientes probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap a partir del análisis de máxima verosimilitud (Figura 10).

La filogenia (Figura 10) muestra un fuerte soporte (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 94%) para la monofilia de *Dendropsophus parviceps* con las especies hermanas *D. frosti* y *D. brevifrons*. El clado de *D. frosti* y *D. brevifrons* tiene un buen soporte (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 98%). Las distancias *p* no corregidas dentro de *D. brevifrons* van de 8.6 a 9.9%.

El clado de *Dendropsophus parviceps* es monofilético con alto soporte (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 100%), dentro de este clado hay dos clados con alto soporte. El primero es de poblaciones de Ecuador (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 99%). Dentro del clado de Ecuador hay tres subclados con alto soporte. El primer subclado (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 99%) pertenece a poblaciones de la Cuenca del Río Pastaza (nombrado clado Pastaza; Figura 11) con elevaciones hasta los 1600 m, y que corresponden a las provincias de Pastaza y Tungurahua. Las distancias genéticas dentro del clado Pastaza van de 0 a 0.4%. Sin embargo, existen individuos que están en la Cuenca del Río Napo y corresponden al clado Pastaza: QCAZ 49314 (Zanjarajuno) y QCAZ 38332 (Arajuno). El segundo subclado (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 99%) está conformado por poblaciones de la Cuenca del Río Napo (nombrado clado Napo; Figura 11) con elevaciones hasta los 1430 m, corresponden a las provincias de Napo, Sucumbíos, Orellana y el norte de Pastaza. Las distancias genéticas en el clado Napo tienen un rango de 0 a 1.8%. El tercer subclado (probabilidad posterior = 1 y bootstrap = 99%) incluye poblaciones de las cuencas del Río Morona y Río Santiago (nombrado clado Morona-Santiago; Figura 11) con elevaciones por debajo de 300 m en la provincia de Morona Santiago. Las poblaciones de Tukupi y Puerto Morona están en la Cuenca del Río Morona y la población de Santiago está en la Cuenca del Río Santiago. Las distancias genéticas en el clado Morona-Santiago tienen un rango de 0 a 0.6%. Una descripción más detallada de las cuencas hidrográficas se presenta en el Anexo 6.

El segundo clado dentro de *Dendropsophus parviceps* es fuertemente apoyado (probabilidad posterior = 0.96 y bootstrap = 72%) y pertenece a poblaciones de Perú (clado Perú). Las distancias genéticas en el clado Perú tienen un rango de 0 a 3.5%. Las distancias genéticas entre todos los clados se presentan en la Tabla 4.

5.2. ESTIMACIÓN DE BARRERAS GEOGRÁFICAS

En el análisis de estimación de barreras en el programa Barrier v2.2 se definieron cinco barreras de discontinuidad genética (nombradas *a–e* en la Figura 12; Anexo 4). A continuación enumero las barreras en orden de importancia. La primera barrera (*a*) separa las poblaciones de Ecuador y Perú coincidiendo con la filogenia. Las barreras segunda y tercera (*b* y *c*; Figura 13) separan poblaciones de Perú. La segunda barrera está localizada al sur de Perú en las regiones del Cusco amazónico y Madre de Dios separando a las poblaciones de La Convención y Tambopata de las demás poblaciones de Perú. La tercera barrera está entre la región de Loreto y San Martín dividiendo las poblaciones de Requena y Picota. Las barreras segunda y tercera coinciden con la filogenia. Las barreras cuarta y quinta (*d* y *e*; Figura 14) separan poblaciones de Ecuador. La cuarta barrera está al norte de la Amazonía ecuatoriana separando las poblaciones de la Cuenca del Río Napo de las poblaciones de la Cuenca del Río Pastaza. A excepción de los individuos: QCAZ 49314 (Zanjarajuno) y QCAZ 38332 (Arajuno) que a pesar de ser parte de la Cuenca del Río Napo son agrupados en la Cuenca del Río Pastaza (al igual que en la filogenia). La quinta barrera separa a las poblaciones que están en la Cuenca del Río Pastaza con las poblaciones que están en las cuencas del Río Morona y Río Santiago. Sin embargo, la quinta barrera no coincide con la filogenia debido a que la divergencia del clado Morona-Santiago vs. el resto de poblaciones de Ecuador es más importante que la cuarta barrera. La prueba de Mantel reveló una correlación positiva entre distancias genéticas y distancias topográficas (Figura 15). La correlación intra clados fue significativa (Tabla 5).

5.3. RED DE HAPLOTIPOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

Las redes de haplotipos obtenidas para cada gen mitocondrial (12S, ND1 y CO1) son consistentes con la filogenia. Las redes para 12S, ND1 y CO1 (Figura 16, 17, 18) muestran cuatro grupos de haplotipos bien diferenciados agrupando separadamente a los haplotipos de la Cuenca del Río Pastaza (color azul), de la Cuenca del Río Napo (color anaranjado), de las cuencas de los ríos Morona y Santiago (color verde) y Perú (color rojo). Dos individuos que están en la Cuenca del Río Napo, QCAZ 49314 (Zanjarajuno) y QCAZ 38332 (Arajuno), se agrupan con los haplotipos de la Cuenca del Río Pastaza (al igual que en la filogenia) (Anexo 7, 8, 9). La divergencia más alta se da entre haplotipos de Ecuador y Perú debido a que están separados por un gran número de pasos mutacionales (rango de 6 a 84 pasos) mostrando una pronunciada estructura genética entre haplotipos en las tres redes.

La diversidad haplotípica es más alta para el clado Perú que para los otros clados en todos los genes. Además este clado muestra una alta diversidad nucleotídica con respecto a los demás clados (para todos los genes). Los análisis de diversidad para cada gen y clado se muestran en la Tabla 6.

5.4. TESTS DE HIPÓTESIS BIOGEOGRÁFICAS

Los resultados de las pruebas de bootstrap paramétrico se muestran en la Tabla 7. La hipótesis de monofilia recíproca para el Río Napo puede ser rechazada con un $P = 0.015$ (Figura 19A) de este modo no se apoya la hipótesis de barreras fluviales. Por otra parte, la hipótesis de monofilia recíproca para la Cuenca del Río Napo y la Cuenca del Río Pastaza no pudo ser rechazada con un $P = 0.095$ (Figura 19B) apoyando la hipótesis de

cuencas hidrográficas. La hipótesis para zonas altitudinales bajas y altas puede ser rechazada con un $P < 0.05$ (Figura 19C), un resultado inconsistente con la hipótesis de gradientes ambientales. Sin embargo, no se pudo rechazar las hipótesis de monofilia recíproca de zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Napo ($P = 0.14$; Figura 19D) y de zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Pastaza ($P = 0.445$; Figura 19E). Estas dos pruebas apoyan la hipótesis de gradientes ambientales en cuencas hidrográficas.

5.5. ANÁLISIS BIOACÚSTICOS

Los datos bioacústicos revelaron dos tipos de canto: simple y compuesto. El canto simple tiene una sola nota. El canto compuesto tiene dos componentes, el primer componente es una nota introductoria como un zumbido y el segundo son clics que son notas secundarias del canto compuesto.

Las medidas de las variables bioacústicas para el canto simple se presentan en la Tabla 8. El canto de la población de Picota en Perú difiere de los cantos de las poblaciones ecuatorianas por tener una menor frecuencia dominante, una mayor duración del canto, un mayor número de pulsos por nota y un mayor tiempo de subida de la nota (Figura 20; Tabla 8). En el ACP de canto simple se obtuvieron dos componentes principales con eigenvalues > 1 , explicando el 92.2% de la variación total (Tabla 9). El CP I tiene cargas positivas para tiempo de subida y duración de la nota, y carga negativa para frecuencia dominante. El CP II tiene cargas positivas para el número de pulsos y la tasa de pulsos (Tabla 9). En el espacio bioacústico del ACP (Figura 21) hay un solapamiento entre poblaciones de Sarayaku, Canelos y Río Verde pertenecientes al clado Pastaza con

poblaciones de Puerto Morona y Santiago del clado Morona-Santiago. La población de Picota del clado Perú presenta una clara separación con las poblaciones de Ecuador en el CP I. De igual manera, la población de Yasuní del clado Napo también mostró separación a lo largo del CP I.

Los resultados de la prueba t de Student para los valores de los Componentes Principales del canto simple se muestran en la Tabla 10. En el CP I hay diferencias significativas entre la población de Picota vs. las poblaciones de Ecuador (Tabla 10). De igual manera, los valores del CP I mostraron diferencias significativas entre las poblaciones de Yasuní vs. el resto de poblaciones de Ecuador (Tabla 10). Por otra parte, se observó diferencias significativas en el CP I entre poblaciones de Sarayaku y Canelos (zonas bajas) con Río Verde (zona alta) (Tabla 10).

Las medidas de las variables del canto compuesto están en la Tabla 11. El canto compuesto de la población de Picota se diferencia de las poblaciones de Ecuador por tener una menor frecuencia dominante para el canto compuesto y los clics (Figura 22, Tabla 11). En el ACP se obtuvo dos componentes principales con eigenvalues > 1 , explicando el 88.09 % de la variación total (Tabla 12). El CP I tiene cargas positivas para tiempo de subida y duración del canto. El CP II tiene carga positiva para frecuencia dominante y alta carga negativa para intervalo entre el primer componente y el clic (Tabla 12). En el espacio bioacústico del ACP (Figura 23) existe una segregación entre las poblaciones Sarayaku y Canelos (zonas bajas) vs. Río Verde (zona alta). Los resultados de la prueba t de Student para los valores de CP del canto compuesto se encuentran en la Tabla 13.

5.6. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Las estadísticas descriptivas de las seis variables morfométricas son mostradas en la Tabla 14. En el ACP para poblaciones de machos, los dos primeros componentes con eigenvalues >1 explican el 52.2% de la variación total (Tabla 15). El CP I tiene cargas positivas para LF, LT y LP, y el CP II tiene cargas positivas para LC y AC (Tabla 15). La proyección de los especímenes muestra que están solapados entre clados en el espacio morfométrico del ACP (Figura 24). En el ACP para poblaciones hembras, los dos primeros componentes con eigenvalues >1 explican el 71.2% de la variación total (Tabla 15). El CP I tiene cargas positivas para LC, LF, LT y LP, y el CP II tiene carga positiva para AC y cargas negativas para LF y LT (Tabla 15). Al igual que el ACP para machos, los especímenes están solapados entre clados (Figura 25). La diferencia entre sexos fue significativa (MANOVA, $F = 1.4$, $GL = 5$, $P < 0.001$). No se observó variación de LRC entre clados (Tabla 14).

En la clasificación de Análisis de Función Discriminante (AFD) en machos, 43 de 77 especímenes fueron asignados correctamente a su respectivo clado. Siete especímenes clasificados erróneamente del clado Pastaza fueron asignados al clado Napo y siete al clado Morona-Santiago. Once especímenes del clado Napo fueron clasificados erróneamente asignados al clado Pastaza y seis al clado Morona-Santiago, y tres especímenes del clado Morona-Santiago fueron asignados al clado Pastaza. En el AFD en hembras, ocho de 30 especímenes fueron clasificados erróneamente. Cuatro especímenes del clado Napo fueron asignados al clado Pastaza, dos al clado Morona-Santiago y dos del clado Pastaza fueron asignados al clado Napo. Estos resultados indican que hay mayor diferenciación morfológica en hembras que en machos.

6. DISCUSIÓN

6.1. RELACIONES FILOGENÉTICAS EN *Dendropsophus parviceps*

Los análisis filogenéticos en este estudio agrupan con alto soporte a *Dendropsophus parviceps* como grupo hermano de las especies *D. brevifrons* y *D. frosti*. Estos análisis son congruentes con las filogenias presentadas por Motta *et al.* (2012) y Rivera-Correa y Orrico (2013). Sin embargo, este estudio brinda nueva información acerca de la posición filogenética de *D. frosti* y *D. brevifrons*, en donde *D. brevifrons* es parafilética, con alto soporte, con respecto a *D. frosti*. Esta relación parafilética sugiere la existencia de más de una especie dentro de *D. brevifrons*. La alta divergencia genética (distancias *p* no corregidas = 8.6–9.9%) observada en 12S entre poblaciones de *D. brevifrons* también sugiere la presencia de diversidad críptica. Resultados similares se han reportado en otros estudios como Caminer y Ron (2014) y Funk *et al.* (2011) con el complejo de especies *Hypsiboas fasciatus-calcaratus*; Elmer *et al.* (2007) con *Pristimantis ockendeni* y Funk *et al.* (2007) con *Engystomops petersi*.

La monofilia de *Dendropsophus parviceps* tiene un alto soporte en los análisis filogenéticos. Dentro de este clado, cuatro subclados con alto soporte fueron identificados. Hay una divergencia basal entre las poblaciones de Perú y Ecuador. Las distancias genéticas entre clados de Ecuador y el clado Perú es alta (distancias *p* no corregidas en 12S = 2–6%) sugiriendo que son especies distintas. Además, la moderada divergencia (distancias *p* no corregidas en 12S = 0–3.5%) dentro del clado Perú indica que existe más de una especie. Varios estudios en anuros también han reportado altas distancias genéticas > 3% para delimitar posibles especies candidatas. Por ejemplo, Elmer *et al.* (2013) con

Bolitoglossa equatoriana y *B. peruviana*, Fouquet *et al.* (2013) con varias especies del género *Adenomera*, Funk *et al.* (2007) y Funk *et al.* (2011) con *Engystomops petersi*, Jansen *et al.* (2011) con varias poblaciones de anuros en Bolivia y Köhler *et al.* (2010) con el grupo de especies *Hypsiboas pulchellus*.

El clado Morona-Santiago es linaje hermano de los clados hermanos Pastaza y Napo formando un grupo monofilético con alto soporte. La divergencia genética entre los clados de Ecuador es baja (distancias *p* no corregidas en 12S = 0.3–2.6%) con respecto al 3%, umbral sugerido para identificar linajes como especies candidatas (Fouquet *et al.*, 2007b; Vences *et al.*, 2005a; Vences *et al.*, 2005b). Otros estudios también han reportado baja divergencia genética para identificar especies candidatas dentro de especies: Coloma *et al.* (2012) con especies del grupo *Hyloscirtus larinopygion*; Matsui *et al.* (2010) con bufónidos del género *Ansonia*; Ron *et al.* (2006) con *Engystomops randi* y Ron *et al.* (2012) con el complejo de especies *Osteocephalus buckleyi*. No obstante, Funk *et al.* (2011) y Vieites *et al.* (2009) utilizaron un rango entre 1–2% en 12S y 16S para poder delimitar especies. Por lo cual, la utilización del umbral mínimo del 3% de divergencia genética para identificar especies candidatas propuesto por Fouquet *et al.* (2007b) es controversial. Una sola línea de evidencia es insuficiente para identificar linajes evolutivos independientes y va en contra del concepto evolutivo de especie propuesto por de Queiroz (2007). Ron *et al.* (2012) también sugieren que la evidencia molecular es una herramienta insuficiente para delimitar especies y necesita ser integrada con datos bioacústicos y morfológicos. Padial *et al.* (2009) recomiendan la utilización de varias líneas de evidencia para evaluar la separación de linajes.

6.2. BIOGEOGRAFÍA Y RELACIONES FILOGEOGRÁFICAS DENTRO DE *Dendropsophus parviceps*

La principal barrera de discontinuidad genética ocurre entre los clados de Ecuador y el clado basal de Perú. Probablemente esta alta diferenciación genética entre clados se explica por eventos de vicarianza, por aislamiento reproductivo precigótico (se discutirá más adelante) y aislamiento por distancia. Amézquita *et al.* (2009) evidenciaron una fuerte diferenciación de cantos correlacionada con la divergencia genética y las distancias geográficas entre poblaciones de *Allobates femoralis*. Además, dentro del clado Perú existe una alta divergencia genética que se explica por aislamiento por distancia. Esta presunción es apoyada por la prueba de Mantel que mostró un fuerte efecto de las distancias topográficas en la estructura genética en las poblaciones de *D. parviceps*. Estos resultados son congruentes con Guarnizo y Cannatella (2013) donde reportan que la compleja topografía influye en la reducción del flujo génico. Recientes estudios también han reportado un efecto de las distancias geográficas en la estructura genética como en Lampert *et al.* (2003) donde encontraron un alto grado de diferenciación genética de las poblaciones de *Engystomops pustulosus* a través de largas distancias geográficas. Velásquez *et al.* (2013) encontraron que la divergencia entre poblaciones de *Pleurodema thaul* se debe a aislamiento por distancia. Posiblemente esta correlación de distancias genéticas con distancias geográficas se deba a que la mayoría de anfibios presentan una baja vagilidad y una fuerte dependencia con el hábitat (Zeisset y Beebee, 2008). Lo cual explicaría la alta divergencia dentro del clado Perú ya que son poblaciones que están más distantes en comparación con los clados ecuatorianos que tienen poblaciones más cercanas entre sí. Sin embargo, la falta de muestras intermedias dentro del clado Perú podría estar

sesgando la verdadera influencia de las distancias topográficas sobre las distancias genéticas.

Por otra parte, los datos filogenéticos y las barreras de discontinuidad genética sugieren que las cuencas hidrográficas son responsables de la estructura genética de las poblaciones ecuatorianas de *D. parviceps* ya que han actuado como barreras al flujo génico. Zeisset y Beebee (2008) proponen que la mayoría de anfibios conservan señales de eventos históricos que han promovido su dispersión y vicarianza. Anteriores estudios han tratado de explicar la distribución de las especies en la Amazonía ecuatoriana, tal como Barriga (2012) que divide la distribución de peces de agua dulce en zonas ictiohidrográficas. En Cisneros-Heredia y McDiarmid (2006) dividen la distribución de centrolénidos en la Amazonía ecuatoriana en dos secciones: la sección norte incluye las provincias de Sucumbíos, Orellana, Napo, Tungurahua y el norte de la provincia de Pastaza (arriba de la latitud 2° S), y la sección sur incluye las provincias de Morona Santiago, Zamora Chinchipe y el sur de la provincia de Pastaza (debajo de la latitud 2° S). Sin embargo, este es el primer estudio de vertebrados terrestres en demostrar que la diversidad genética está correlacionada espacialmente con la extensión de cuencas hidrográficas en la Amazonía.

Las bajas distancias genéticas reportadas (ver sección 6.1) entre clados ecuatorianos de *Dendropsophus parviceps* sugieren que la diferenciación entre poblaciones es reciente. Asumiendo una tasa de evolución para 12S de 0.00249 sustituciones por sitio por linaje (basado en *Xenopus*; Evans *et al.*, 2004) se espera una divergencia del 0.498% por millón de años entre dos linajes ($0.00249 \times 100 \times 2$). Por lo cual, el tiempo de divergencia de *D. parviceps* podría haber ocurrido en el Plioceno-Pleistoceno (6–1 Ma). Para el límite del

Mioceno-Plioceno hasta el Pleistoceno tardío (6–0.1 Ma) (Bernal *et al.*, 2011; Bès de Berc *et al.*, 2005) se formó el abanico de sedimentos del Pastaza o “Pastaza megafan”, el cual explicaría la influencia de las cuencas hidrográficas en la estructura genética de las poblaciones ecuatorianas. Puesto que para el Mioceno tardío-Plioceno el actual sistema fluvial de la Amazonía ya estaba establecido (Antonelli *et al.*, 2009). Este abanico está localizado en las estribaciones de la Amazonía de Ecuador y al norte de Perú, entre 2° y 5° S y entre 74° y 78° O (Bernal *et al.*, 2011). De acuerdo con este escenario, entre las cuencas hidrográficas presuntamente ocurrieron diferentes eventos de vicarianza que afectaron a los clados. Una probable explicación estaría ligada con los cambios repentinos en el curso de los drenajes y afluentes localizados especialmente en los límites entre las cuencas. De esta manera, se crearon conexiones y desconexiones entre cuencas dando como resultado zonas pantanosas o áridas produciendo barreras del flujo génico entre las poblaciones. Esta presunta explicación está basada en los modelos propuestos en los estudios de Wilkinson *et al.* (2006) y Wilkinson *et al.* (2010) donde explican la especiación de fauna acuática suramericana en abanicos de sedimentación.

Para el Plioceno-Pleistoceno (6–1 Ma) ocurrió la formación de la meseta de Mera, depositada en lo alto del “Pastaza megafan”, en lo que hoy es el alto del Río Pastaza (Bès de Berc *et al.*, 2005). Esta meseta posiblemente actuó como un puente de conexión entre la Cuenca del Río Napo y la Cuenca del Río Pastaza. De esta manera, se produjo la dispersión de los individuos QCAZ 49314 (Zanjarajuno) y QCAZ 38332 (Arajuno) de la Cuenca del Napo hacia la Cuenca del Pastaza.

Los resultados de las redes de haplotipos revelan una profunda estructura filogeográfica de los clados de *Dendropsophus parviceps* sugiriendo que los cuatro clados

evolucionan en conjuntos de poblaciones geográficamente separadas. Estos resultados apoyan a las estructuras filogeográficas mencionadas anteriormente tal como el aislamiento por distancia y la especiación de poblaciones de diferentes cuencas hidrográficas por el abanico del Pastaza.

6.3. PRUEBA DE HIPÓTESIS DE MECANISMOS DE DIVERSIFICACIÓN

La hipótesis de barreras fluviales no fue apoyada por los análisis de bootstrap paramétrico señalando que el Río Napo no es una barrera de flujo génico para *D. parviceps*. Las poblaciones en bancos opuestos del río no son monofiléticas. Estos resultados son congruentes con varios estudios en la Amazonía como Funk *et al.* (2007) con *Engystomops petersi* en el Río Napo, Gascon *et al.* (1996, 1998, 2000) en diferentes especies de anfibios en el Río Juruá, Loughheed *et al.* (1999) con *Allobates femoralis* en el Río Juruá y Ron *et al.* (2013b) con varias especies de anfibios en el Río Napo. En contraste, otros estudios apoyan la hipótesis de barreras fluviales para anfibios como Fouquet *et al.* (2012a) en *Adenomera andreae*, Gehring *et al.* (2012) en anfibios del género *Heterixalus* en Madagascar y Lampert *et al.* (2003) con *Engystomops pustulatus*.

La efectividad del Río Napo como barrera fluvial podría estar dependiendo de la variación del curso del río a lo largo del tiempo y de la habilidad de dispersión de anfibios, la cual está influenciada por la historia de vida y el modo reproductivo. *Dendropsophus parviceps* deposita sus huevos como masas globulares en cuerpos de agua (grandes lagos, estanques o charcos) (Duellman y Crump, 1974; Duellman, 1978; Hödl, 1990). Este modo de reproducción podría facilitar la conectividad entre poblaciones a través de barreras fluviales e influir en la estructura genética impidiendo que poblaciones de lados opuestos

del río sean recíprocamente monofiléticas. Otros estudios en anfibios han demostrado que la conectividad y el flujo génico entre poblaciones van a depender de los modos de reproducción, ya que promueven y mantienen la estructura genética. Por ejemplo, Fouquet *et al.* (2012a) muestran que el desarrollo directo de *Adenomera andreae* influye en la dispersión a lo largo del Río Approuague, Funk *et al.* (2009) señalan que el modo reproductivo de dos especies de *Engystomops* en hábitats que son escasos y lejanos uno con otro limita la dispersión y el flujo génico entre poblaciones y Kaefer *et al.* (2012) demostraron que el desarrollo directo de dos especies de *Allobates* restringe la dispersión y flujo génico entre poblaciones de lados opuestos del Río Madeira.

Los resultados de bootstrap paramétrico no muestran apoyo a la hipótesis de gradientes ambientales para zonas bajas y altas en *D. parviceps*, pero proveen de soporte a esta hipótesis para la monofilia de zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Napo y para la monofilia de zonas bajas y altas en la Cuenca del Río Pastaza. Estos resultados sugieren que existieron eventos independientes de dispersión desde zonas bajas a zonas altas en cada cuenca hidrográfica. Por otra parte, los resultados de bootstrap paramétrico apoyan a la monofilia de las cuencas del Napo y del Pastaza señalando que los límites entre grupos genéticos corresponden a los límites entre cuencas hidrográficas. Todos estos resultados sugieren que los eventos de vicarianza que sucedieron en el abanico del Pastaza (se discutió anteriormente) son responsables de la estructura genética de las poblaciones de *D. parviceps* en cada cuenca hidrográfica, ya que actuaron como barreras históricas.

Por otro lado, el rápido levantamiento de los Andes del norte durante el Plioceno (Chaves *et al.*, 2011; Weir y Price, 2011) produjo posibles cambios en la temperatura y en

las tasas de evolución de clima y de nicho (Guarnizo y Cannatella, 2013; Hutter *et al.*, 2013). Bajo este escenario se explicaría la divergencia ecológica a lo largo de gradientes ambientales observada en poblaciones de *D. parviceps* de zonas altitudinales bajas y altas para las cuencas del Napo y del Pastaza sugiriendo una posible especiación parapátrica. Varios estudios han reportado similar escenario de especiación como Graham *et al.* (2004) en dendrobátidos, Ogden y Torpe (2002) en *Anolis roquete*, Ron *et al.* (2012) en *Osteocephalus festae* y *Osteocephalus verruciger*, Ron *et al.* (2013a) en el grupo de especies *Phyllomedusa perinesos* y Salermo *et al.* (2012) en *Tepuihyla* y su especie hermana *Osteocephalus exophthalmus*. Sin embargo, existe flujo génico a través de los gradientes ambientales entre poblaciones de *D. parviceps* de zonas bajas y de zonas altas al no mostrar una profunda divergencia entre clados parapátricos, sugiriere que los eventos de dispersión fueron recientes.

Por otra parte, el límite superior de la distribución altitudinal de *Dendropsophus parviceps* es de 1600 m reportado para la localidad de Río Verde (Tungurahua). El primer registro para esta localidad fue realizado en el año 1962 por el Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian. En este estudio se propone a *D. parviceps* como la séptima especie del género *Dendropsophus* con el mayor rango altitudinal después de *D. labialis*, *D. pelidna*, *D. meridensis*, *D. carnifex*, *D. minutus* y *D. sarayacuensis*. Las otras especies de este género están por debajo de los 1500 m (Bustamante *et al.*, 2005; Guarnizo *et al.*, 2009). Muchas veces la falta de muestreo no permite estimar el límite superior o inferior de la distribución altitudinal de anfibios. Asimismo, el incremento de temperatura consecuencia del calentamiento global podría también estar influenciando en la distribución altitudinal para varias comunidades de anfibios (Bustamante *et al.*, 2005; Ron *et al.*, 2003).

6.4. ENFOQUE INTEGRATIVO Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES

Los análisis morfológicos de este estudio indican que no existe variación morfométrica entre clados de *Dendropsophus parviceps* de Ecuador. Varios estudios taxonómicos en anfibios también han reportado que los caracteres morfológicos son altamente conservados para poder delimitar especies (Fouquet *et al.*, 2007b; Fouquet *et al.*, 2012b; Loughheed *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2006). Por ejemplo, Fouquet *et al.* (2012b) en *Dendrophryniscus* y *Amazonella*, Funk *et al.* (2011) en *Engystomops* y Elmer *et al.* (2007) en *Pristimantis*. No obstante, mediciones morfométricas realizadas en el estudio de Duellman (2005) en poblaciones de *D. parviceps* en el Cusco amazónico muestran que el promedio de LRC en machos es de 20.36 mm y de hembras es de 24.50 mm siendo más grandes con respecto al promedio de LRC de poblaciones de Ecuador: machos 16.5 mm y hembras 23.02 mm. Estas diferencias morfométricas entre poblaciones ecuatorianas y peruanas sugieren que podrían ser especies distintas. Además, una revisión de caracteres morfológicos cualitativos podría revelar diferencias entre clados y facilitar la delimitación de especies. Recientes estudios han reportado que los caracteres morfológicos cualitativos son importantes para diferenciar especies crípticas como en Pareja (2013) con el complejo de especies *Hypsiboas cinerascens* y Caminer y Ron (2014) con el complejo de especies *Hypsiboas calcaratus* e *H. fasciatus*.

De igual manera, los análisis bioacústicos en *Dendropsophus parviceps* muestran diferencias en los cantos simples entre las poblaciones de Ecuador con la población de Picota en Perú en lo que se refiere a la frecuencia dominante, duración de la nota y tiempo de subida de la nota. La frecuencia dominante en poblaciones de Ecuador es más alta con respecto la población de Picota, estos datos son congruentes con Duellman (2005) quien también reportó un patrón similar entre poblaciones de *D. parviceps* de la Amazonía

ecuatoriana y peruana. Varios estudios sugieren que la frecuencia dominante ha generado preferencias de las hembras para reconocer cantos de machos locales reduciendo el flujo génico como en Funk *et al.* (2009) y Boul *et al.* (2009) con *Engystomops petersi*, Roy y Elepfandt (1993) con anuros de la India y Padial *et al.* (2008) con el grupo de especies *Oreobates discoidalis*. Por lo cual los resultados para la frecuencia dominante de cantos simples en este estudio podrían estar causando aislamiento reproductivo precigótico sobretodo entre poblaciones de Ecuador y Perú. Por otra parte, las diferencias encontradas en la frecuencia dominante de los cantos entre zonas bajas y altas en el clado Pastaza serían consistentes con la existencia de barreras reproductivas entre poblaciones de zonas altas y bajas.

Este estudio reporta por primera vez en *Dendropsophus parviceps* dos tipos de canto: un canto simple y un canto compuesto. Debido a que la primera descripción del canto fue realizada por Duellman y Crump (1974) en donde describen al canto como una corta nota aguda sin notas secundarias. La duración de la nota reportada en Duellman y Crump (1974) fue de 0.13 segundos y la frecuencia dominante promedio fue de 6221 Hz. Estos datos son similares a los datos obtenidos en este estudio para el canto simple.

En este estudio el análisis integrativo ha ayudado a identificar posibles linajes evolutivos independientes. El clado Perú es categorizado como ECC debido a su monofilia recíproca, alta divergencia genética, alta diferenciación bioacústica y diferenciación morfológica de acuerdo con las mediciones realizadas en Duellman (2005). Dentro de este clado hay evidencia de probables ECNC debido a las distancias genéticas (3.5%) observadas. La localidad tipo de *Dendropsophus parviceps* es Sarayaku, Provincia de Pastaza, Ecuador, este sitio es parte del clado fuertemente apoyado Pastaza, por lo cual los

individuos peruanos deben ser revaluados en su status taxonómico. Para los clados de Ecuador no hubo evidencia fuerte para considerar los linajes independientes, por lo cual son categorizados como linajes profundos intraespecíficos. Estos análisis integrativos también han ayudado a descubrir linajes crípticos dentro grupos de especies altamente diversos y taxonómicamente complejos (Padial y de la Riva, 2009), como es el caso de Fouquet *et al.* (2013) con varias especies de *Adenomera*, Funk *et al.* (2011) con los complejos de especies *Engystomops petersi* e *Hypsiboas calcaratus-fasciatus*, Jansen *et al.* (2011) con varias poblaciones de anuros en Bolivia, Köhler *et al.* (2010) con el grupo de especies *Hypsiboas pulchellus*, Padial *et al.* (2009) y Padial y de la Riva (2009) con *Pristimantis*.

En conclusión, este estudio revela que los mecanismos de diversificación que han contribuido en la estructura genética de poblaciones de *D. parviceps* han sido las cuencas hidrográficas, los gradientes ambientales, el aislamiento por distancia y el aislamiento reproductivo precigótico. El efecto de las barreras fluviales fue rechazado ya que no influyen en la diversificación de especies. La reciente divergencia de *D. parviceps* a partir del Plioceno sugiere que el abanico del Pastaza fue el gran promotor de la composición genética de las poblaciones en cuencas hidrográficas. Este es el primer estudio en proponer a las cuencas hidrográficas como mecanismos de diversificación. También se comprobó que el cambio topográfico, como el levantamiento de los Andes, tiene un efecto en la evolución de nichos y climas a lo largo de gradientes ambientales promoviendo la dispersión de zonas bajas hacia zonas altas. Como era de esperarse debido a la baja vagilidad de anuros las distancias topográficas tuvieron un fuerte efecto en las distancias genéticas. Asimismo, la preferencia de la hembra por el canto local también podría estar generando aislamiento reproductivo precigótico. Este estudio también reveló que la

utilización de varias líneas de evidencia agrupadas en un enfoque integrativo ayudaron a poder identificar especies crípticas. Ya que el género *Dendropsophus* posee una alta variación intra e interespecífica (Orrico *et al.*, 2013) un análisis integrativo ayudaría a la descripción de nuevas especies como Moravec *et al.* (2008) describen a *D. reichlei*, Motta *et al.* (2012) a *D. frosti*, Ortega-Andrade y Ron (2013) a *D. shiwiarum* y Rivera-Correa y Orrico (2013) a *D. manonegra*.

7. LITERATURA CITADA

- Amézquita, A., Lima, A.P., Jehle, R., Castellanos, L., Ramos, O., Crawford, A.J., Gasser, H. y Hödl, W. 2009. Calls, colours, shape, and genes: a multi-trait approach to the study of geographic variation in the Amazonian frog *Allobates femoralis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 98: 826–838.
- AmphibiaWeb, 2014. Information on amphibian biology and conservation (web application). Berkeley, California. <<http://amphibiaweb.org/>> [Febrero 2014].
- Antonelli, A., Nylander, J.A.A., Persson, C. y Sanmartín, I. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 9749–9754.
- Antonelli, A., Quijada-Mascareñas, A., Crawford, A.J., Bates, J.M., Velazco, P.M. y Wüster, W. 2010. Molecular studies and phylogeography of Amazonian tetrapods and their relation to geological and climatic models. En: *Amazonia: Landscape and species evolution. A look into the past.* (Hoorn, C. y Wesselingh, F., eds) pp. 386–404. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.
- Bandelt, H-J., Forster, P. y Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Barriga, R. 2012. Lista de peces de agua dulce e intermareales del Ecuador. *Revista Politécnica* 30: 83–119.
- Bass, M.S., Finer, M., Jenkins, C.N., Kreft, H., Cisneros-Heredia, D.F., McCracken, S.F., Pitman, N.C., English, P.H., Swing, K., Villa, G., Di Fiore, A., Voigt, C.C. y Kunz, T.H. 2010. Global conservation significance of Ecuador's Yasuni National Park. *Plos One* 5: e8767.
- Beebee, T. y Rowe, G. 2008. *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press.

- Bernal, C., Christophoul, F., Darrozes, J., Soula, J. C., Baby, P. y Burgos, J. 2011. Late Glacial and Holocene avulsions of the Rio Pastaza Megafan (Ecuador-Peru): frequency and controlling factors. *International Journal of Earth Sciences* 100: 1759–1782.
- Bès de Berc, S., Soula, J. C., Baby, P., Souris, M., Christophoul, F. y Rosero, J. 2005. Geomorphic evidence of active deformation and uplift in a modern continental wedge-top–foredeep transition: example of the eastern Ecuadorian Andes. *Tectonophysics* 399: 351–380.
- Bioacoustics Research Program. 2008. Raven Pro: Interactive sound analysis software (Version 1.3) [Computer software]. Ithaca, NY: The Cornell Lab of Ornithology. <<http://www.birds.cornell.edu/raven>>.
- Bokermann, W.C.A. 1963. Duas espécies novas de *Hyla* de Rondônia, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 23: 247–250.
- Boul, K.E., Funk, W.C., Darst, C.R., Cannatella, D.C. y Ryan, M.J. 2007. Sexual selection drives speciation in an Amazonian frog. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 399–406.
- Boulenger, G.A. 1882. Catalogue of the Batrachia Salientia s. Ecaudata in the collection of the British Museum. 2nd ed. London: Taylor and Francis.
- Brown, J.H. y Lomolino, M.V. 1998: Biogeography. 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Bustamante, M.R., Ron, S.R. y Coloma, L.A. 2005. Cambios en la diversidad en siete comunidades de anuros en los Andes de Ecuador. *Biotropica* 37: 180–189.
- Caminer, M.A. y Ron, S.R. 2014. Systematics of treefrogs of the *Hypsiboas calcaratus* and *Hypsiboas fasciatus* species complex (Anura, Hylidae) with the description of four new species. *ZooKeys* 370: 1–68.

- Chaves, J.A., Weir, J.T. y Smith, T.B. 2011. Diversification in *Adelomyia* hummingbirds follows Andean uplift. *Molecular Ecology* 20: 4564–4576.
- Chevion, Z.A. Hackett, S.J. y Capparella, A.P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 338–357.
- Cisneros-Heredia, D.F. y McDiarmid, R.W. 2006. A new species of the genus *Centrolene* (Amphibia: Anura: Centrolenidae) from Ecuador with comments on the taxonomy and biogeography of Glassfrogs. *Zootaxa* 1244: 1–32.
- Coloma, L.A., Carvajal-Endara, S., Duenas, J.F., Paredes-Recalde, A., Morales-Mite, M., Almeida-Reinoso, D., Tapia, E.E., Hutter, C.R., Toral, E. y Guayasamin, J.M. 2012. Molecular phylogenetics of stream treefrogs of the *Hyloscirtus larinopygion* group (Anura: Hylidae), and description of two new species from Ecuador. *Zootaxa* 3364: 1–78.
- Colwell, R.K. 2000. A barrier runs through it or maybe just a river. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13470–13472.
- Crottini, A., Brown, J.L., Mercurio, V., Glaw, F., Vences, M. y Andreone, F. 2012. Phylogeography of the poison frog *Mantella viridis* (Amphibia: Mantellidae) reveals chromatic and genetic differentiation across ecotones in northern Madagascar. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 50: 305–314.
- Dayrat, B. 2005. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879–886.

- Duellman, W.E. 1970. The hylid frogs of Middle America. Monograph of the Museum of Natural History, the University of Kansas. Number 1: 1–753.
- Duellman, W.E. 1978. The biology of an equatorial herpetofauna in Amazonian Ecuador. The University of Kansas Museum of Natural History. Miscellaneous Publication No. 65.
- Duellman, W.E. 1999. Patterns of distribution of amphibians: a global perspective. The Johns Hopkins University Press.
- Duellman, W. E. 2005. Cusco amazónico: The lives of amphibians and reptiles in an amazonian rainforest. Comstock Books in Herpetology Cornell University Press.
- Duellman, W.E. y Crump, M.L. 1974. Speciation in frogs of the *Hyla parviceps* group in the upper Amazon basin. Occasional Papers of the Museum of Natural History the University of Kansas Lawrence 23: 1–40.
- Duellman, W.E. y Trueb, L. 1989. Two new treefrogs of the *Hyla parviceps* group from the Amazon Basin in southern Peru. Herpetologica 45: 1–10.
- Drummond, A.J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Duran, C., Field, M., Heled, J., Kearse, M., Markowitz, S., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T. y Wilson, A. 2011. Geneious v5.4, disponible en <<http://www.geneious.com>> [Febrero 2013].
- Elmer, K.R., Dávila, J.A. y Loughheed, S.C. 2007. Cryptic diversity and deep divergence in an upper Amazonian leaf litter frog, *Eleutherodactylus ockendeni*. BMC Evolutionary Biology 7: 247.
- Elmer, K.R., Bonett, R.M., Wake, D.B. y Loughheed, S. C. 2013. Early Miocene origin and cryptic diversification of South American salamanders. BMC Evolutionary biology 13: 1–16.

- Evans, B.J., Kelley, D.B., Tinsley, R.C., Melnick, D.J. y Cannatella, D.C. 2004. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 197–213.
- Faivovich, J., Haddad, C.F.B., García, P.C.A., Frost, D.R., Campbell, J.A. y Wheeler, W.C. 2005. Systematic review of the frog family Hylidae, with special reference to Hylineae: phylogenetic analysis and taxonomic revisión. *Bulletin of the American Museum of Natural History*: 1–229.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.
- Fouquet, A., Vences, M., Salducci, M-D., Meyer, A., Martly, C., Blanc, M. y Gilles, A. 2007a. Revealing cryptic diversity using molecular phylogenetics and phylogeography in frogs of the *Scinax ruber* and *Rhinella margaritifera* species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 567–582.
- Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M. y Gemmell, N.J. 2007b. Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one* 2: e1109.
- Fouquet, A., Noonan, B., Blanc, M. y Orrico, V. G. D. 2011. Phylogenetic position of *Dendropsophus gaucheri* (Lescure and Marty 2000) highlights the need for an in-depth investigation of the phylogenetic relationships of *Dendropsophus* (Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3035: 59–67.
- Fouquet, A., Ledoux, J-B., Dubut, V., Noonan, B.P. y Scotti, I. 2012a. The interplay of dispersal limitation, rivers, and historical events shapes the genetic structure of an Amazonian frog. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 356–373.

- Fouquet, A., Recoder, R., Texeira Jr, M., Cassimiro, J., Amaro, R.C., Camacho, A., Damasceno, R., Carnaval, A.C., Moritz, C. y Rodrigues, M.T. 2012b. Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 826–838.
- Fouquet, A., Cassini, C.S., Haddad, CF.B., Pech, N. y Trefaut Rodrigues, M. 2013. Species delimitation, patterns of diversification and historical biogeography of the Neotropical frog genus *Adenomera* (Anura, Leptodactylidae). *Journal of Biogeography*: 1–16.
- Frost, D. R. 2013. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Versión 5.6 Base de datos electrónica disponible en <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>> American Museum of Natural History, New York, USA. [Enero 2013].
- Funk, W.C., Caldwell, J.P., Peden, C.E., Padial, J.M., De la Riva, I. y Cannatella, D.C. 2007. Tests of biogeographic hypotheses for diversification in the Amazonian forest frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 825–837.
- Funk, W.C., Cannatella, D.C. y Ryan, M.J. 2009. Genetic divergence is more tightly related to call variation than landscape features in the Amazonian frogs *Physalaemus petersi* and *P. freibergi*. *Journal of evolutionary biology* 22: 1838–1853.
- Funk, W.C., Caminer, M. y Ron, S.R. 2011. High levels of cryptic species diversity uncovered in Amazonian frogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 1806–1814.

- Gascon, C., Loughheed, S.C. y Bogart, J.P. 1996. Genetic and morphological variation in *Vanzolinius discodactylus*: a test of the river hypothesis of speciation. *Biotropica* 28: 376–387.
- Gascon, C., Loughheed, S.C. y Bogart, J.P. 1998. Patterns of genetic differentiation in four species of Amazonian frogs: a test of the riverine barrier hypothesis. *Biotropica* 30: 104–119.
- Gascon, C., Malcolm, J.R., Patton, J.L., da Silva, M.N.F., Bogart, J.P., Loughheed, S.C., Peres, C.A., Neckel, S. y Boag, P.T. 2000. Riverine barriers and the geographic distribution of Amazonian species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 13672–13677.
- Gehring, P.-S., Pabijan, M., Randrianirina, J.E., Glaw, F. y Vences, M. 2012. The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 64: 618–632.
- Goin, C.J. 1960. Description of a new frog of the genus *Hyla* from northwestern Brazil. *Annals and Magazine of Natural History* 2: 721–724.
- Goin, C.J. 1966. A new frog of the genus *Hyla* from British Guiana. *Quarterly Journal of the Florida Academy of Sciences* 29: 39–42.
- Graham, C.H., Ron, S.R., Santos, J.C., Schneider, C.J., y Moritz, C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in dendrobatid frogs. *Evolution* 58: 1781–1793.
- Guarnizo, C. E., Amézquita, A., y Bermingham, E. 2009. The relative roles of vicariance versus elevational gradients in the genetic differentiation of the high Andean tree frog, *Dendropsophus labialis*. *Molecular phylogenetics and evolution* 50: 84–92.

- Guarnizo, C.E. y Cannatella, D.C. 2013. Genetic divergence within frog species is greater in topographically more complex regions. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 51: 333–340.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodiversity and Conservation* 6: 451–476.
- Hayes, F.E. y Sewlal, J.-A.N. 2004. The Amazon river as a dispersal barrier to passerine birds: effects of river width, habitat and taxonomy. *Journal of Biogeography* 31: 1809–1818.
- Hebert, P.D., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S. y Francis, C.M. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology* 2: e312.
- Heyer, W.R. 1977. Taxonomic notes on frogs from the Madeira and Purus rivers, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia* 31: 141–162.
- Hödl, W. 1990. Reproductive diversity in Amazonian lowland frogs. *Fortschritte der Zoologie* 38: 41–60.
- Hoorn, C., Wesselingh, F.P., ter Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C.L., Figueiredo, J.P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F.R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T. y Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science* 330: 927–931.
- Höglund, J. y Shorey, L. 2004. Genetic divergence in the superspecies *Manacus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 81: 439–447.
- Huelsenbeck, J.P., Hillis, D.M. y Nielsen, R. 1996. A likelihood-ratio test of monophyly. *Systematic Biology* 45: 546–558.

- Huelsenbeck, J. P. y Crandall, K. A. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 437–466.
- Hutter, C.R., Guayasamin, J.M. y Wiens, J.J. 2013. Explaining Andean megadiversity: the evolutionary and ecological causes of glassfrog elevational richness patterns. *Ecology letters* 16: 1135–1144.
- Jansen, M., Bloch, R., Schulze, A. y Pfenninger, M. 2011. Integrative inventory of Bolivia's lowland anurans reveals hidden diversity. *Zoologica Scripta* 40: 567–583.
- Kaefer, I.L., Tsuji-Nishikido, B.M., Mota, E.P., Farias, I.P. y Lima, A.P. 2012. The early stages of speciation in amazonian forest frogs: phenotypic conservatism despite strong genetic structure. *Evolutionary Biology*: 1–18.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. y Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Köhler, J., Koscinski, D., Padial, J.M., Chaparro, J.C., Handford, P., Loughheed, S.C., y De la Riva, I. 2010. Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). *Zoologica Scripta* 39: 572–590.
- Lampert, K.P., Rand, A.S., Mueller, U.G. y Ryan, M.J., 2003. Fine-scale genetic pattern and evidence for sex-biased dispersal in the túngara frog, *Physalaemus petersi*. *Molecular Ecology* 12:3325–3334.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. y Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1695–1701.

- Lougheed, S.C., Gascon, C., Jones, D.A., Bogart, J.P. y Boag, P.T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 266: 1829–1835.
- Lougheed, S.C., Austin, J.D., Bogart, J.P., Boag, P.T. y Chek, A.A. 2006. Multi-character perspectives on the evolution of intraspecific differentiation in a neotropical hyliid frog. BMC Evolutionary Biology 6: 23.
- Lynch, J.D. y Duellman, W.E. 1997. Frogs of the genus *Eleutherodactylus* (Leptodactylidae) in western Ecuador: systematics, ecology and biogeography. University of Kansas. Natural History Museum. Special Publication No. 23. University of Kansas Printing Service, Lawrence, Kansas
- Maddison, D.R. 2004. Testing monophyly of a group of beetles. Study 1 en Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.54, <<http://mesquiteproject.org>>.
- Maddison, W.P. y Maddison, D.R. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. <<http://mesquiteproject.org>>.
- Manni, F., Guérard, E. y Heyer, E. 2004. Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. Human Biology 76: 173–190.
- Martins, M. y Cardoso, A.J. 1987. Novas especies de hílideos do Estado do Acre (Amphibia: Anura). Revista Brasileira de Biologia 47: 549–558.

- Matsui, M., Tominaga, A., Liu, W., Khonsue, W., Grismer, L.L., Diesmos, A.C., Das, I., Sudin, A., Yambun, P., Yong, H., Sukumaran, J. y Brown, R.M. 2010. Phylogenetic relationships of *Ansonia* from Southeast Asia inferred from mitochondrial DNA sequences: Systematic and biogeographic implications (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 561–570.
- Moen, D.S. y Wiens, J.J. 2009. Phylogenetic evidence for competitively driven divergence: body-size evolution in Caribbean treefrogs (Hylidae: *Osteopilus*). *Evolution* 63: 195–214.
- Monmonier, M.S. 1973. Maximum-difference barriers: An alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 5: 245–261.
- Moravec, J., Aparicio, J., Guerrero-Reinhard, M., Calderon, G. y Köhler, J. 2008. Diversity of small Amazonian *Dendropsophus* (Anura: Hylidae): another new species from northern Bolivia. *Zootaxa* 1918: 1–12.
- Moritz, C., Patton, J.L., Schneider, C.J. y Smith, T.B. 2000. Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 533–563.
- Motta, A.P., Castroviejo-Fisher, S., Venegas, P.J., Orrico, V.G.D. y Padial, J.M. 2012. A new species of the *Dendropsophus parviceps* group from the western Amazon basin (Amphibia: Anura: Hylidae). *Zootaxa* 3249: 18–30.
- Newman, C.E. 2009. An integrative approach to resolving taxonomic controversy and reconstructing the evolutionary history of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). Doctoral dissertation, The University of Alabama, Tuscaloosa.
- Ogden, R., y Thorpe, R. S. 2002. Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13612–13615.

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Henry, M., Stevens, H. y Wagner, H. 2013. Community Ecology Package. <<http://vegan.r-forge.r-project.org>> [Octubre 2013].
- Orrico, V.G., Duellman, W.E., Souza, M.B. y Haddad, C.F. 2013. The Taxonomic status of *Dendropsophus allenorum* and *Dendropsophus timbeba* (Anura: Hylidae). Journal of Herpetology 47: 615–618.
- Ortega-Andrade, M. y Ron, S.R. 2013. A new species of small tree frog, genus *Dendropsophus* (Anura: Hylidae) from the eastern Amazon lowlands of Ecuador. Zootaxa 3652: 163–178.
- Padial, J.M., Köhler, J., Muñoz, A. y De la Riva, I. 2008. Assessing the taxonomic status of tropical frogs through bioacoustics: geographical variation in the advertisement calls in the *Eleutherodactylus discoidalis* species group (Anura). Zoological Journal of the Linnean Society 152: 353–365.
- Padial, J.M. y de la Riva, I. 2009. Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). Zoological Journal of the Linnean Society 155: 97–122.
- Padial, J.M., Castroviejo-Fisher, S., Köhler, J., Vilà, C., Chaparro, J.C. y De la Riva, I. 2009. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. Zoologica Scripta 38: 431–447.
- Pareja, D. 2012. Sistemática del complejo de especies de *Hypsiboas cinerascens* (Anura: Hylidae) en la Amazonía ecuatoriana. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Pazmiño, D. 2011. Origen de las poblaciones introducidas de *Scinax quinquefasciatus* (Anura: Hylidae) en las islas Galápagos. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

- Pebesma, E., Bivand, R., Rowlingson, B. y Gomez-Rubio, V. 2005. Classes and methods for spatial data in R. <<http://rspatial.r-forge.r-project.org>> [Octubre 2013].
- Pyron, R.A. y Wiens, J.J. 2011. A large-scale phylogeny of amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 543–583.
- Pröhl, H., Koshy, R. A., Mueller, U., Rand, A. S. y Ryan, M. J. 2006 Geographic variation of genetic and behavioral traits in northern and southern túngara frogs. *Evolution* 60: 1669–1679.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<http://www.R-project.org/>>.
- Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2007. Tracer v 1.5. University of Edinburgh. Disponible en <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>> [Noviembre 2013].
- Ribas, C.C., Aleixo, A., Nogueira, A.C.R., Miyaki, A.Y. y Cracraft, J. 2012. A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 681–689.
- Rivera-Correa, M. y Orrico, V.G. 2013. Description and phylogenetic relationships of a new species of treefrog of the *Dendropsophus leucophyllatus* group (Anura: Hylidae) from the Amazon basin of Colombia and with an exceptional color pattern. *Zootaxa* 3686: 447–460.
- Roberts, J.L., Brown, J.L., von May, R., Arizabal, W., Schulte, R. y Summers, K. 2006. Genetic divergence and speciation in lowland and montane peruvian poison frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 149–164.

- Ron, S.R., Duellman, W.E., Coloma, L.A. y Bustamante, M.R. 2003. Population decline of the Jambato toad *Atelopus ignescens* (Anura: Bufonidae) in the Andes of Ecuador. *Journal of Herpetology* 37: 116–126.
- Ron, S.R., Santos, J.C. y Cannatella, D.C. 2006. Phylogeny of the túngara frog genus *Engystomops* (= *Physalaemus pustulosus* species group; Anura: Leptodactylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 392–403.
- Ron, S.R. y Read, M. 2012. *Dendropsophus parviceps*. En: Ron, S.R., Guayasamin, J.M., Yanez-Muñoz, M.H., Merino-Viteri, A. y Ortiz, D.A. *AmphibiaWebEcuador*. Version 2014.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. <<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/FichaEspecie.aspx?Id=1292>> [Enero 2013].
- Ron, S.R., Venegas, P.J., Toral, E., Read, M., Ortiz, D. y Manzano, A.L. 2012. Systematics of the *Osteocephalus buckleyi* species complex (Anura, Hylidae) from Ecuador and Peru. *Zookeys* 229:1–52.
- Ron, S.R., Almendariz, A. y Cannatella, D.C. 2013a. The *Phyllomedusa perinesos* group (Anura: Hylidae) is derived from a Miocene Amazonian Lineage. *Zootaxa* 3741: 289–294.
- Ron, S.R., Caminer, M., Pareja, D. y Rivadeneira-M., D. 2013b. Wallace under scrutiny: Role of the fluvial barriers in the diversification of amazonian amphibians. *Proceedings of the III World Summit on Evolution – Galapagos 2013, 1st – 5th Junio, 2013, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito. Quito – Ecuador. 87 pp.*

- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. y Huelsenbeck, J.P. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogentic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Roux, F. 1927. Contribution à lerpétologie du Venezuela. *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel* 38: 252–261.
- Roy, D. y Elepfandt, A. 1993. Bioacoustic analysis of frog calls from northeast India. *Journal of Biosciences* 18:381–393.
- Rozas, J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2010. DnaSP v5.10.01: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Salerno, P.E., Ron, S.R., Senaris, J.C., Rojas-Runjaic, F.J.M., Noonan, B.P. y Cannatella, D.C. 2012. Ancient Tepui summits harbor young rather than old lineages of endemic frogs. *Evolution* 66: 3000–3013.
- SAS Institute. 2010. JMP 9 ® 9.0.1. Software. <<http://www.jmp.com/software/>>.
- Santos, J.C., Coloma, L.A., Summers, K., Caldwell, J.P., Ree, R. y Cannatella, D.C. 2009. Amazonian amphibian diversity is primarily derived from late Miocene andean lineages. *PLoS biology* 7: e56.
- Simões, P.I., Lima, A.P. y Magnusson, W.E. 2008. Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: relationships with the upper Madeira river and other potential geological barriers. *Biotropica* 40: 607–614.
- Smith, T. B., Wayne, R. K., Girman, D. y Bruford, M. W. 2000. Evaluating the divergence-with-gene-flow model in natural populations: the importance of ecotones in rainforest speciation. En *Tropical rainforests: past, present and future* (Moritz, C., Bermingham, E. y Dick, C., eds) Chicago University Press.

- Stuart, B.L., Inger, R. F. y Voris, H.K. 2006. High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters* 2: 470–474.
- Symula, R., Schulte, R. y Summers, K. 2003. Molecular systematics and phylogeography of Amazonian poison frogs of the genus *Dendrobates*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 452–475.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, United States of America.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- Velásquez, N.A., Marambio, J., Brunetti, E., Méndez, M.A., Vásquez, R.A. y Penna, M. 2013. Bioacoustic and genetic divergence in a frog with a wide geographical distribution. *Biological Journal of the Linnean Society* 110: 142–155.
- Vieites, D.R., Wollenberg, K.C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F. y Vences, M. 2009. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 8267–8272.
- Vences, M., Thomas, M., Van der Meijden, A., Chiari, Y. y Vieites, D. R. 2005a. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2: 1–12.
- Vences, M., Thomas, M., Bonett, R. M. y Vieites, D. R. 2005b. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1859–1868.

- Wallace, A.R. 1852. On the monkeys of the Amazon. Proceedings of the Zoological Society of London 20: 107–110.
- Weir, J.T. y Price, M. 2011. Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. Molecular Ecology 20: 4550–4563.
- Wiens, J.J., 2007. Global patterns of species richness and diversification in amphibians. The American Naturalist 170: S86–S106.
- Wiens, J.J., Fetzner, J.W., Parkinson, C.L. y Reeder, T.W., 2005. Hylid frog phylogeny and sampling strategies for speciose clades. Systematic Biology 54: 778–807.
- Wiens, J.J., Graham, C.H., Moen, D.S., Smith, S.A. y Reeder, T.W. 2006. Evolutionary and ecological causes of the latitudinal diversity gradient in hylid frogs: treefrog trees unearth the roots of high tropical diversity. The American Naturalist 168: 579–596.
- Wiens, J.J., Kuczynski, C.A., Hua, X. y Moen, D.S. 2010. An expanded phylogeny of treefrogs (Hylidae) based on nuclear and mitochondrial sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 55: 871–882.
- Wiens, J.J., Pyron, R.A. y Moen, D.S. 2011. Phylogenetic origins of local-scale diversity patterns and the causes of Amazonian megadiversity. Ecology Letters 14: 643–652.
- Wilkinson, M.J., Marshall, L.G. y Lundberg, J. G. 2006. River behavior on megafans and potential influences on diversification and distribution of aquatic organisms. Journal of South American Earth Sciences 21: 151–172.
- Wilkinson, M.J., Marshall, L.G., Lundberg, J.G. y Kreslavsky, M.H. 2010. Megafan environments in northern South America and their impact on Amazon Neogene aquatic ecosystems. En: Amazonia: Landscape and species evolution. A look into the past. (Hoorn, C. y Wesselingh, F., eds) pp. 162–184. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

- Zeisset, I. y Beebee, T.J.C. 2008. Amphibian phylogeography: a model for understanding historical aspects of species distributions. *Heredity* 101: 109–119.
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

8. FIGURAS

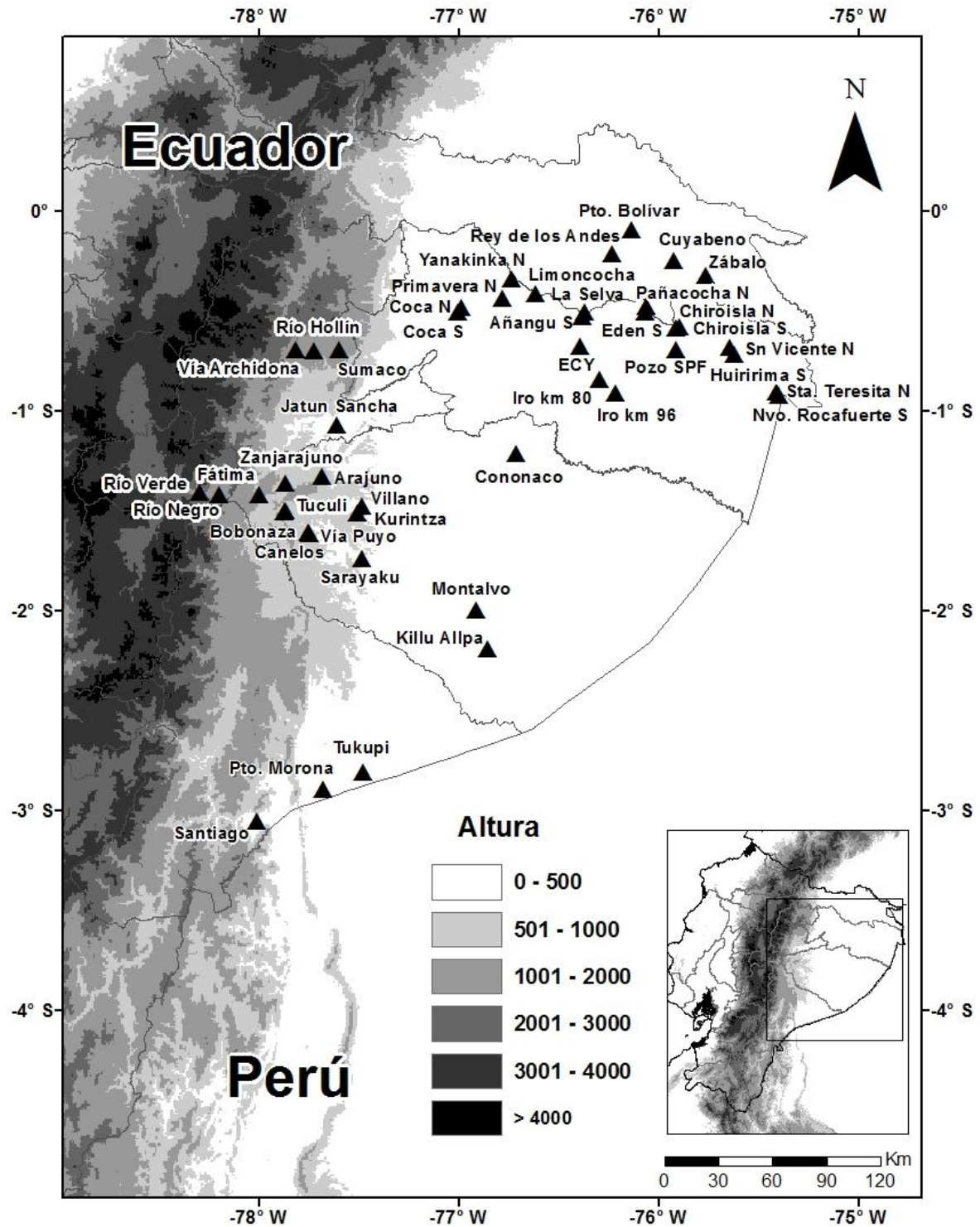


Figura 1. Mapa de localidades muestreadas de *Dendropsophus parviceps* en Ecuador.

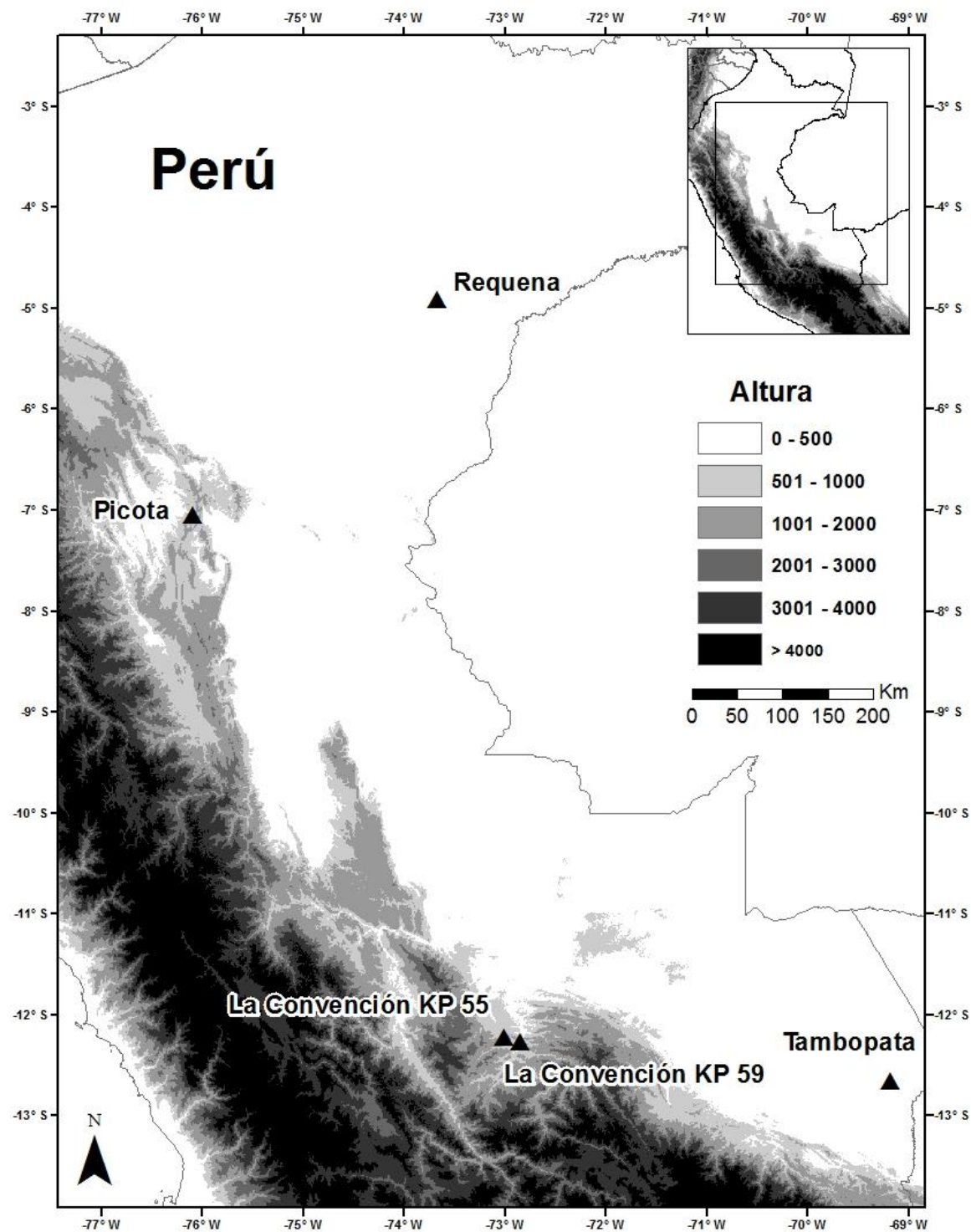
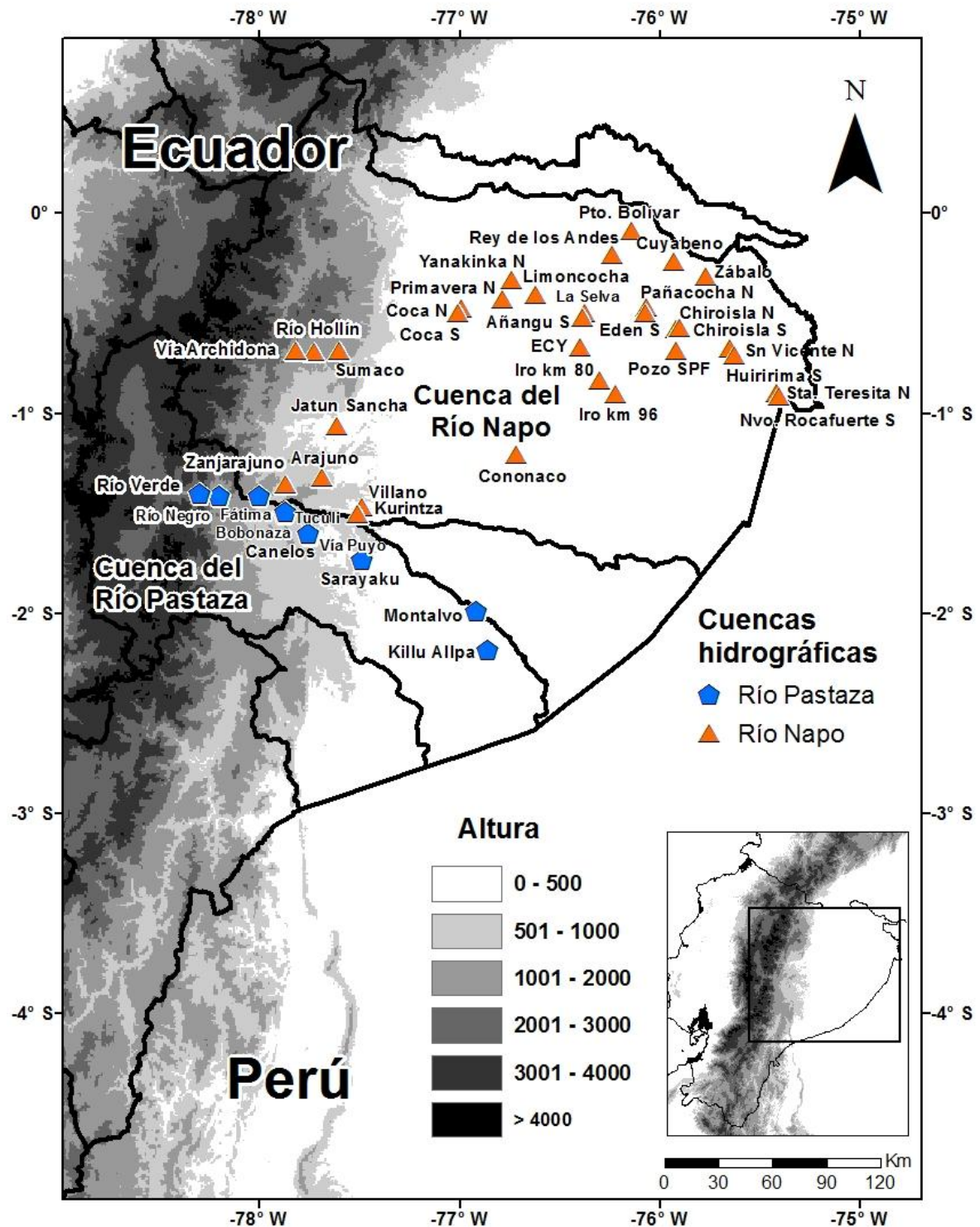


Figura 2. Mapa de localidades muestreadas de *Dendropsophus parviceps* en Perú.



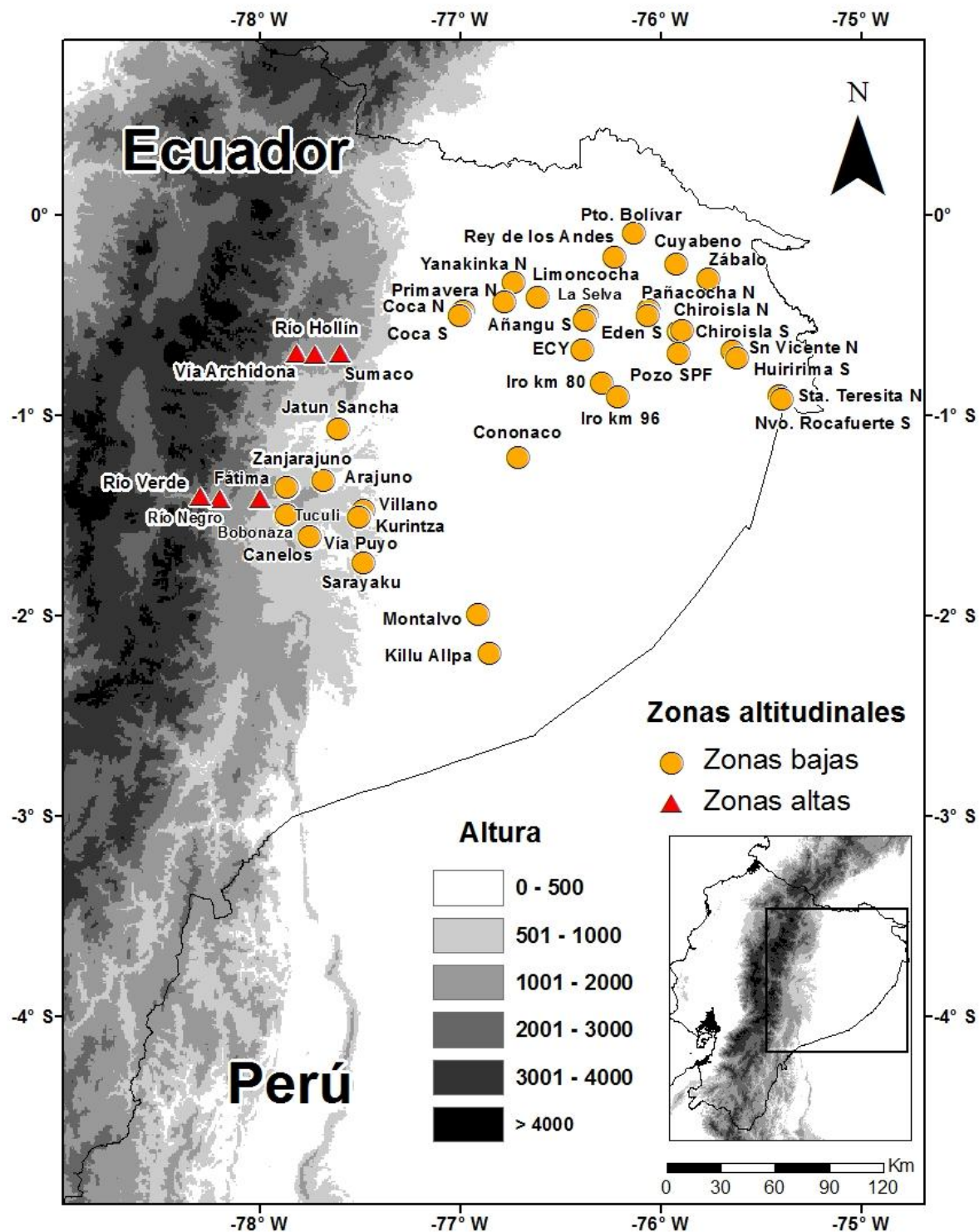


Figura 4. Mapa de localidades de zonas altitudinales altas y bajas de *Dendropsophus parviceps*. Localidades a menos de 1000 m sobre el nivel del mar fueron consideradas como de zona baja y con una elevación mayor a 1000 m como de zona alta.

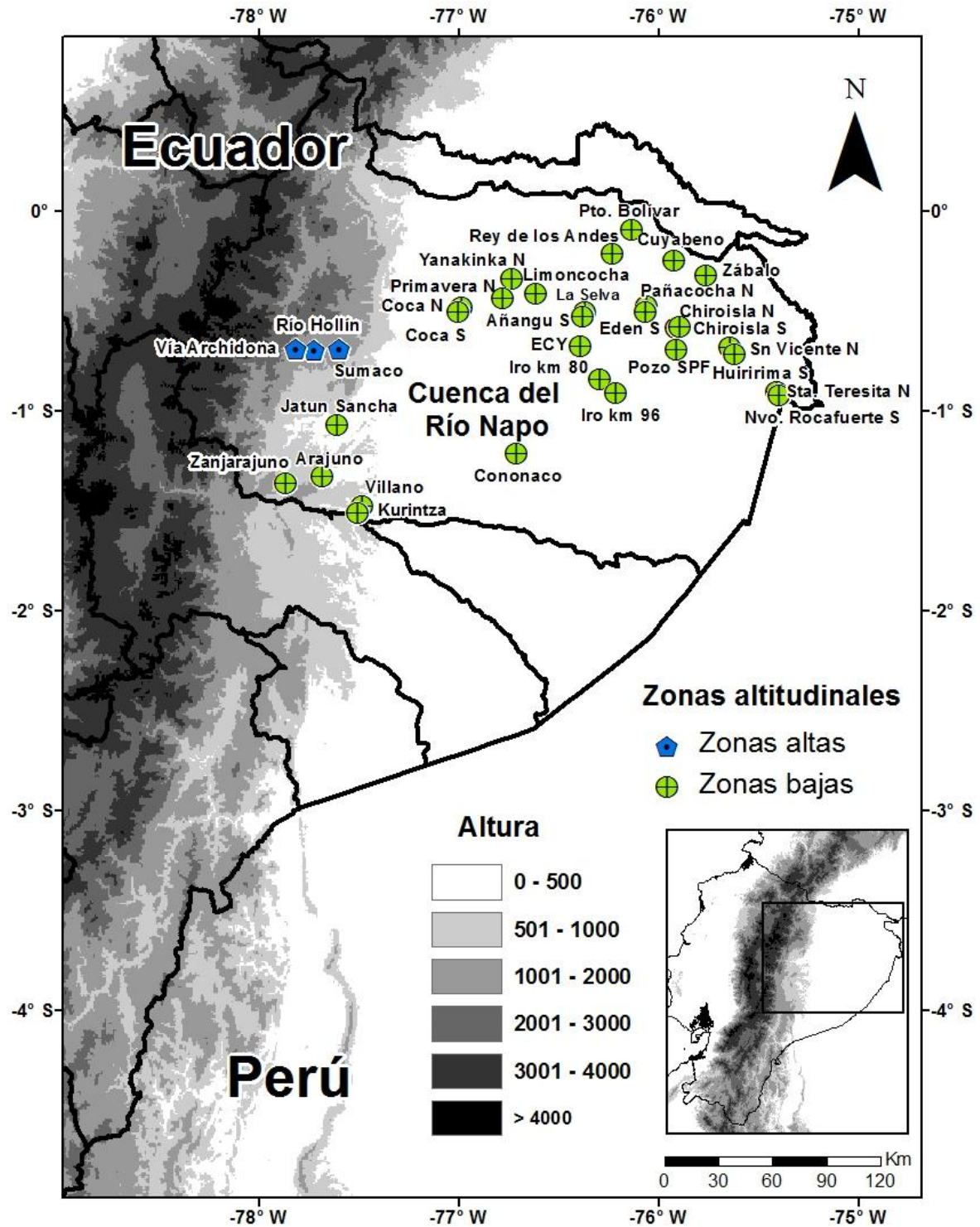


Figura 5. Mapa de localidades de *Dendropsophus parviceps* de zonas altitudinales altas y bajas en la Cuenca del Río Napo. Localidades a menos de 1000 m sobre el nivel del mar fueron consideradas como de zona baja y con una elevación mayor a 1000 m como de zona alta.

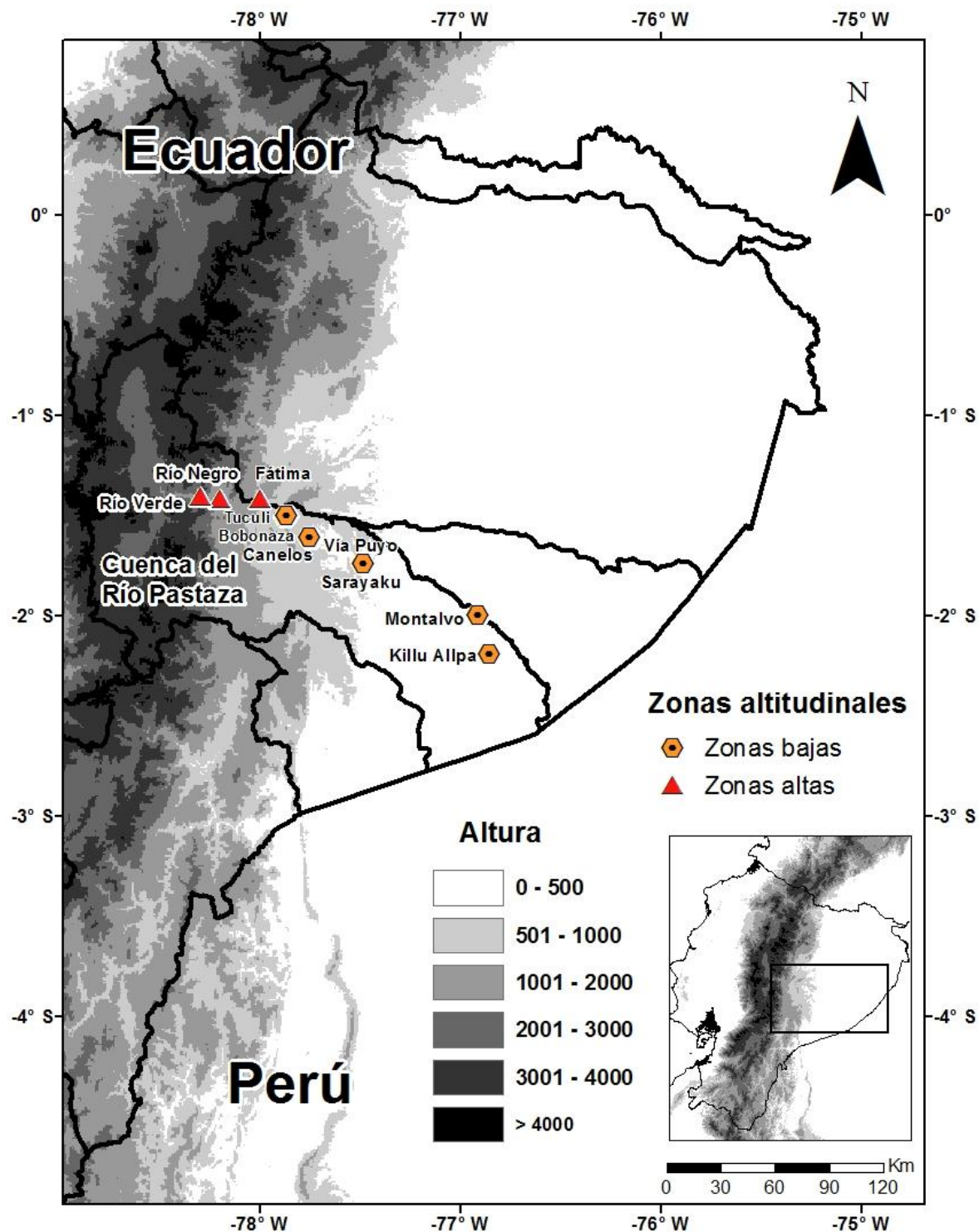


Figura 6. Mapa de localidades de *Dendropsophus parviceps* de zonas altitudinales altas y bajas en la Cuenca del Río Pastaza. Localidades a menos de 1000 m sobre el nivel del mar fueron consideradas como de zona baja y con una elevación mayor a 1000 m como de zona alta.

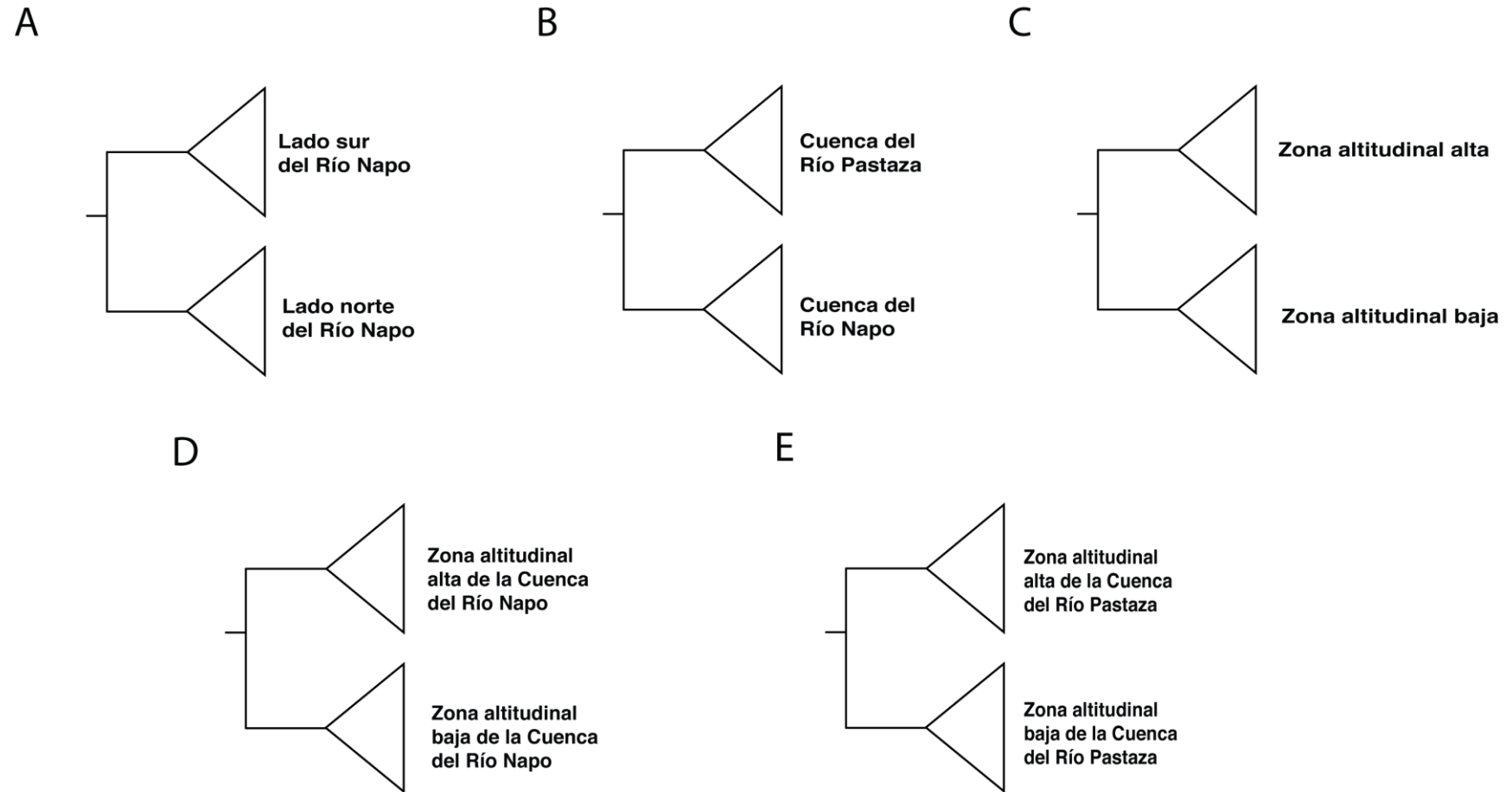


Figura 7. Hipótesis nulas para las pruebas de bootstrap paramétrico entre poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. (A) Hipótesis de barreras fluviales en el Río Napo. (B) Hipótesis de cuencas hidrográficas entre las cuencas del Napo y Pastaza. (C) Hipótesis de gradientes ambientales en zonas bajas y altas. (D) Hipótesis de gradientes ambientales en zonas bajas y altas en la Cuenca del Río Napo. (E) Hipótesis de gradientes ambientales en zonas bajas y altas en la Cuenca del Río Pastaza.

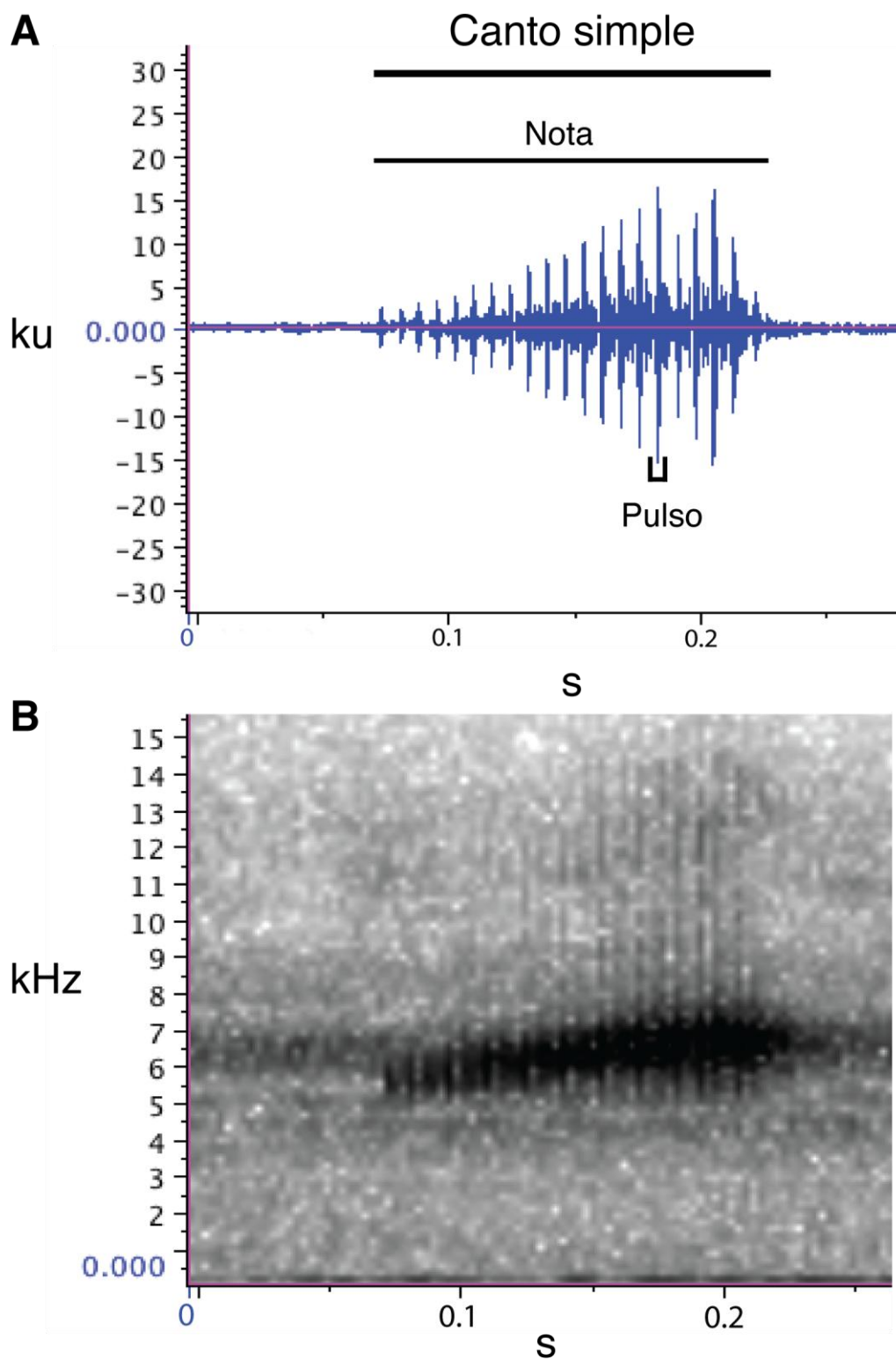


Figura 8. Canto simple de *Dendropsophus parviceps*. (A) Oscilograma. (B) Espectrograma. *D. parviceps* (QCAZ 52753) de Sarayaku, Provincia de Pastaza.

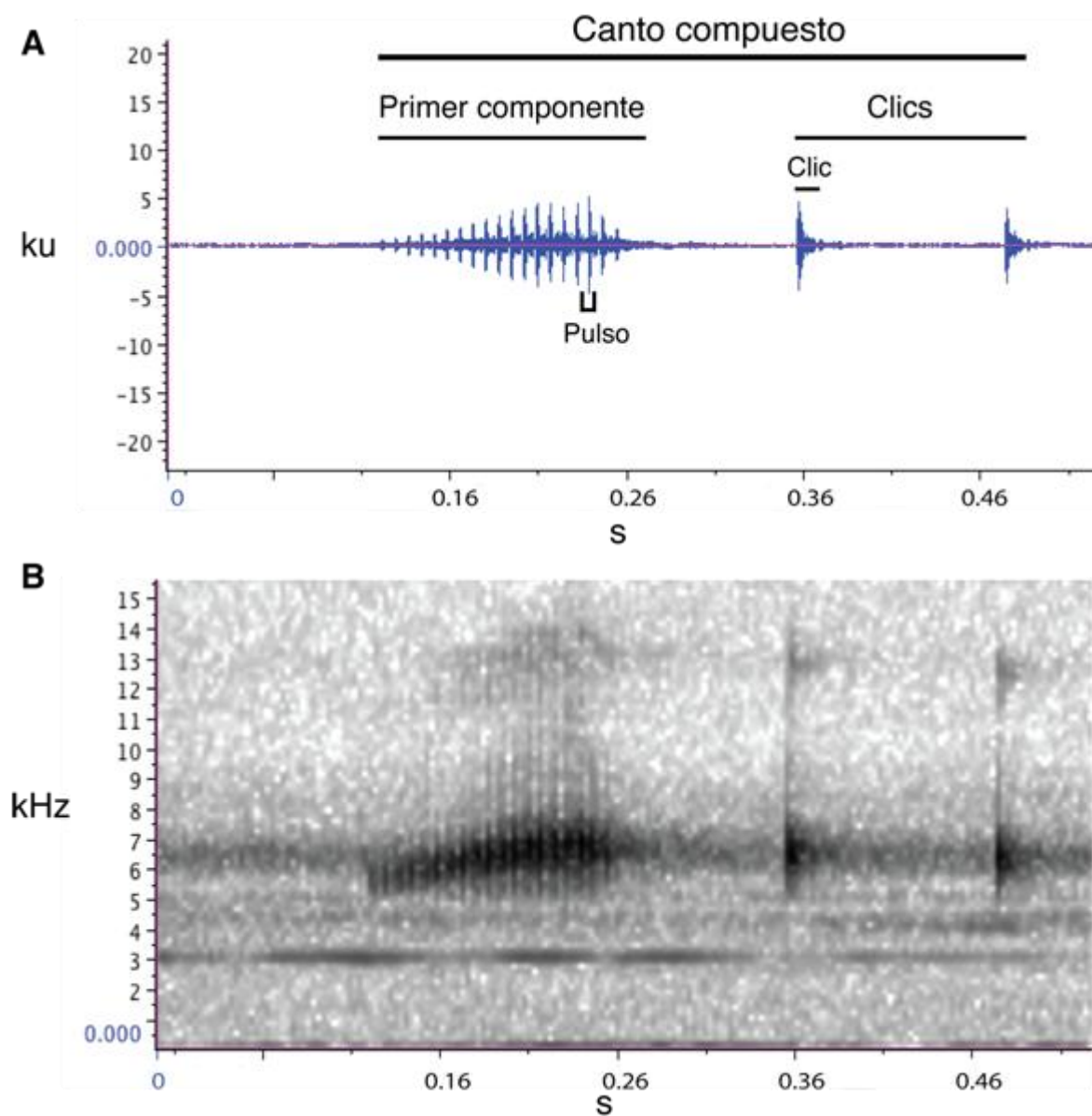


Figura 9. Canto compuesto de *Dendropsophus parviceps*. (A) Oscilograma. (B) Espectrograma. *D. parviceps* (QCAZ 52753) de Sarayaku, Provincia de Pastaza.

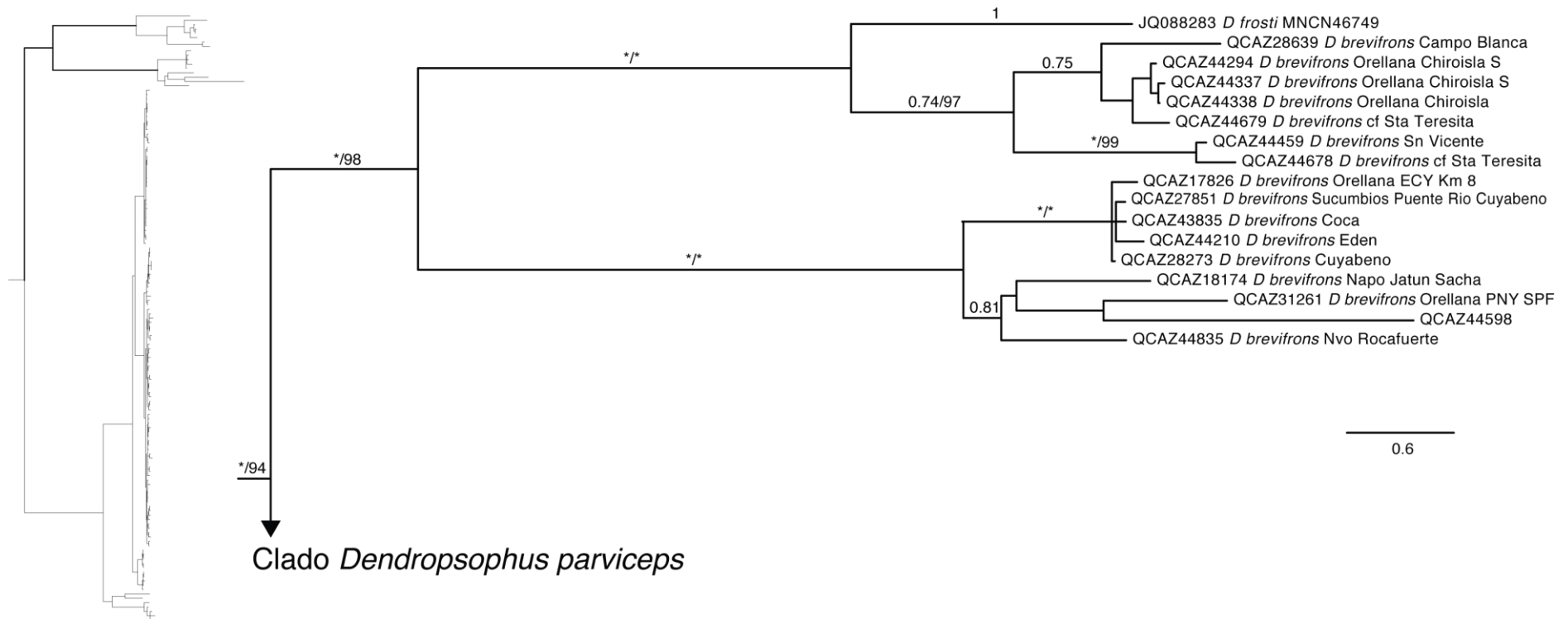


Figura 10. Filograma consenso de Inferencia Bayesiana (IB) representando relaciones dentro del grupo *Dendropsophus parviceps*. El filograma fue derivado a partir del análisis de ~3089 pb de genes mitocondriales (12S, tRNA, ND1 y CO1). El número de colección de cada individuo y su localidad son mostrados. El soporte de los nodos es indicado con el valor de la probabilidad posterior (pp) sobre las ramas producto de búsquedas Bayesianas con el algoritmo de Cadena Markov Monte Carlo y el valor de bootstrap bajo las ramas producto del análisis de Máxima Verosimilitud (MV). Los asteriscos representan un valor de 1 para IB y 100% para MV. Valores de pp < 0.8 y valores de bootstrap < 60% no son mostrados. Las demás especies del grupo externo para *D. parviceps* no se muestran.

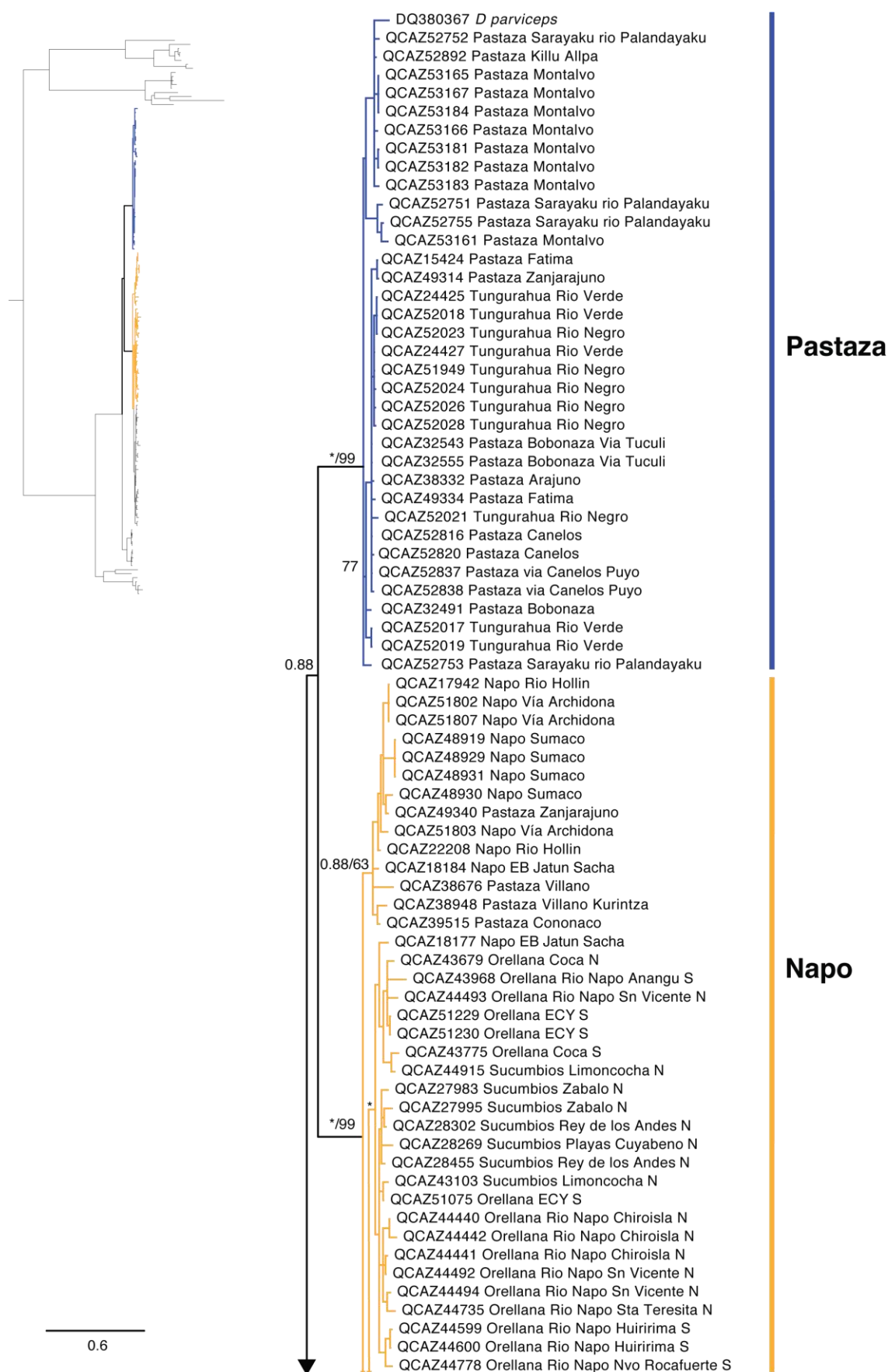
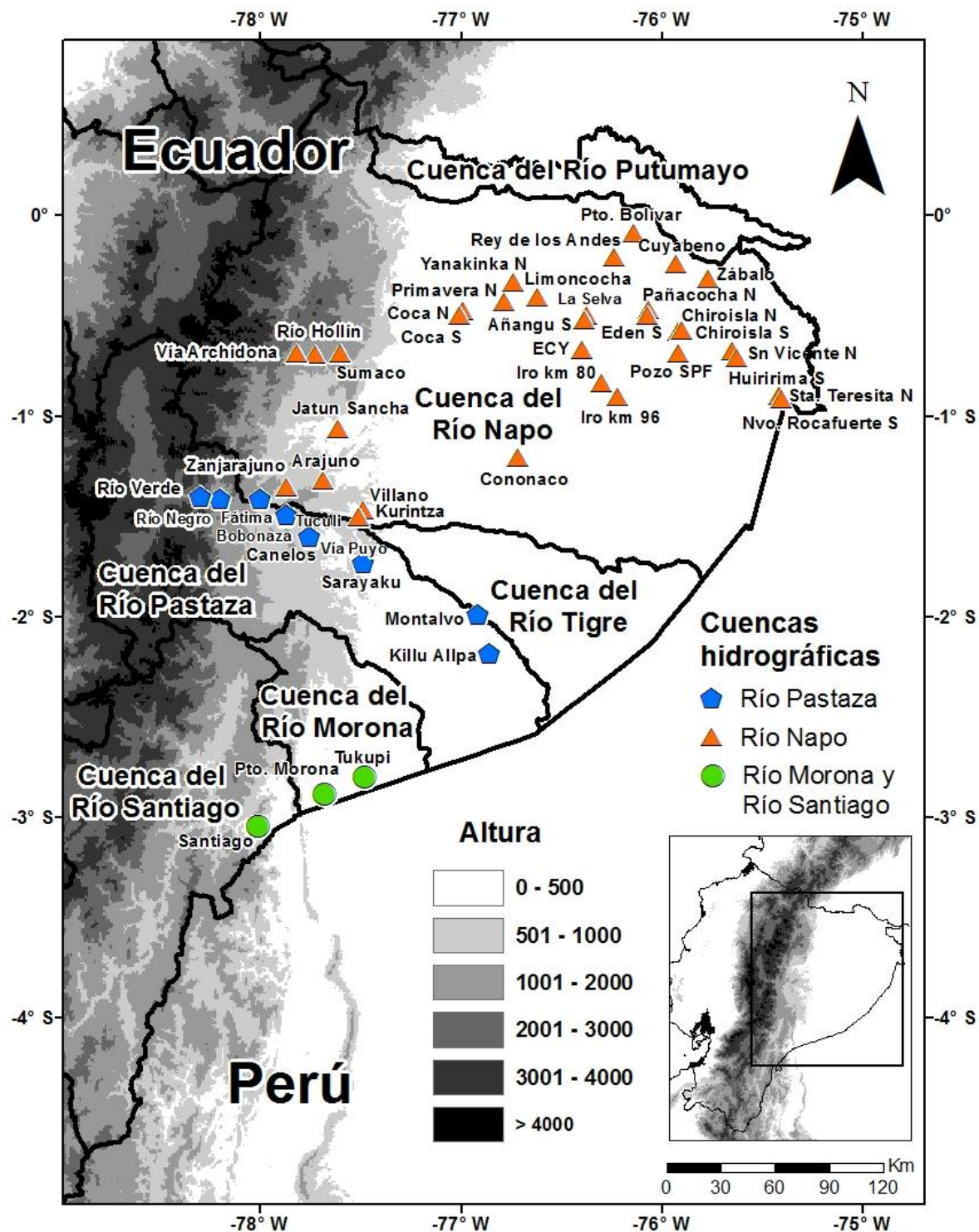


Figura 10. Continuación.



Figura 10. Continuación.



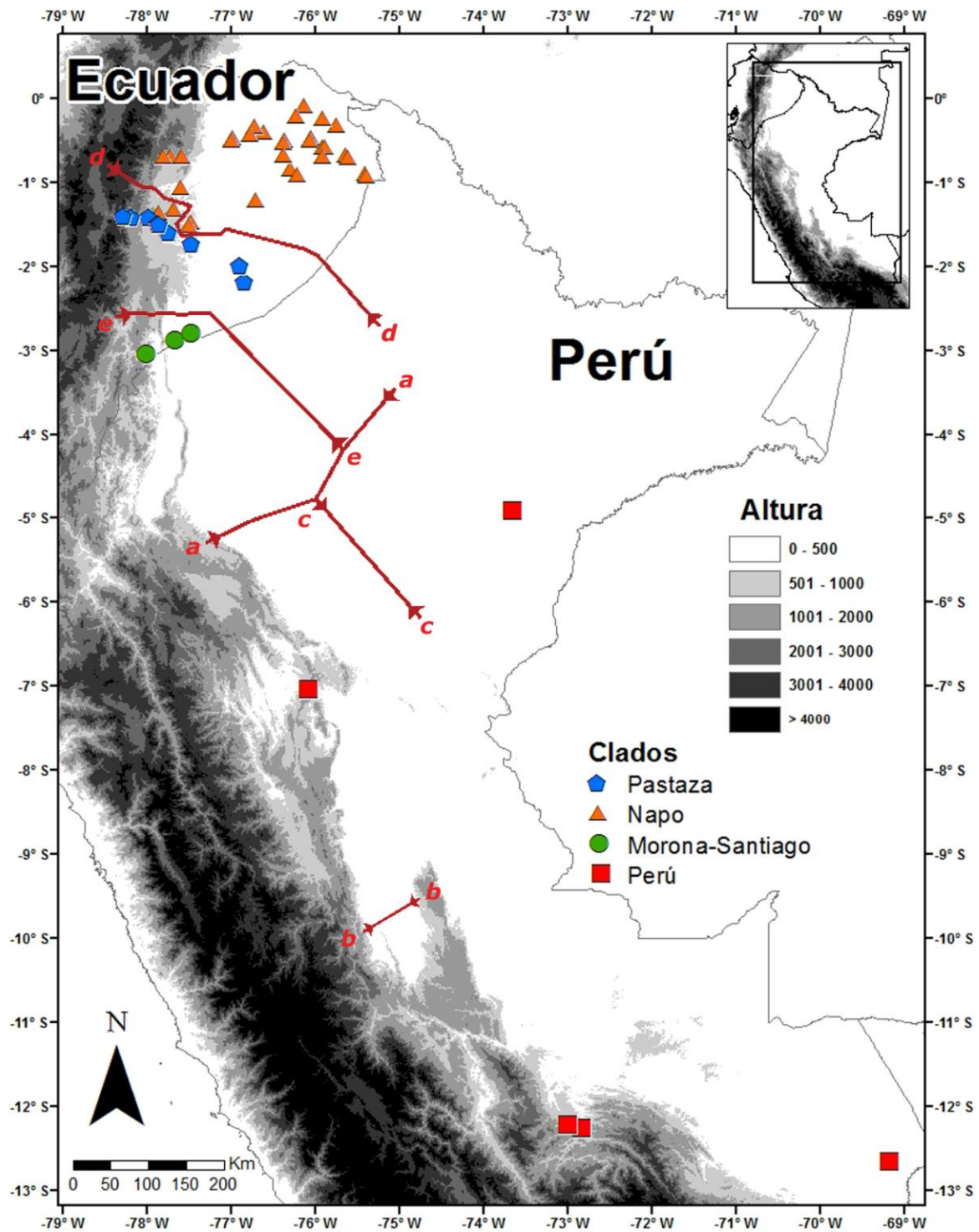


Figura 12. Barreras de discontinuidad genética para *Dendropsophus parviceps*. Las barreras son nombradas con letras minúsculas las cuales están ordenadas por la magnitud de la más (a) a la menos (e) significativa con respecto a la distancia genética.

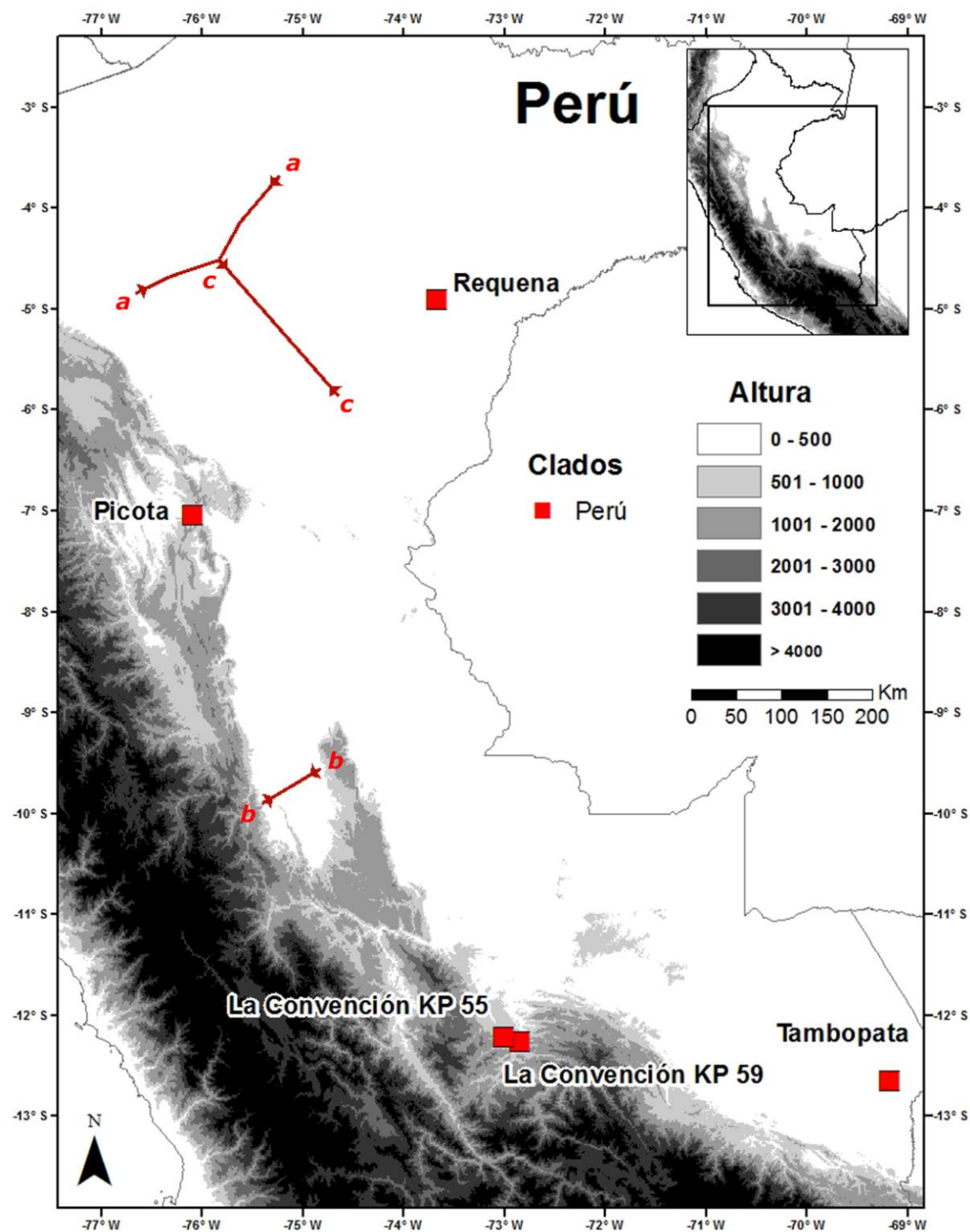


Figura 13. Barreras de discontinuidad genética en localidades de Perú para *Dendropsophus parviceps*.

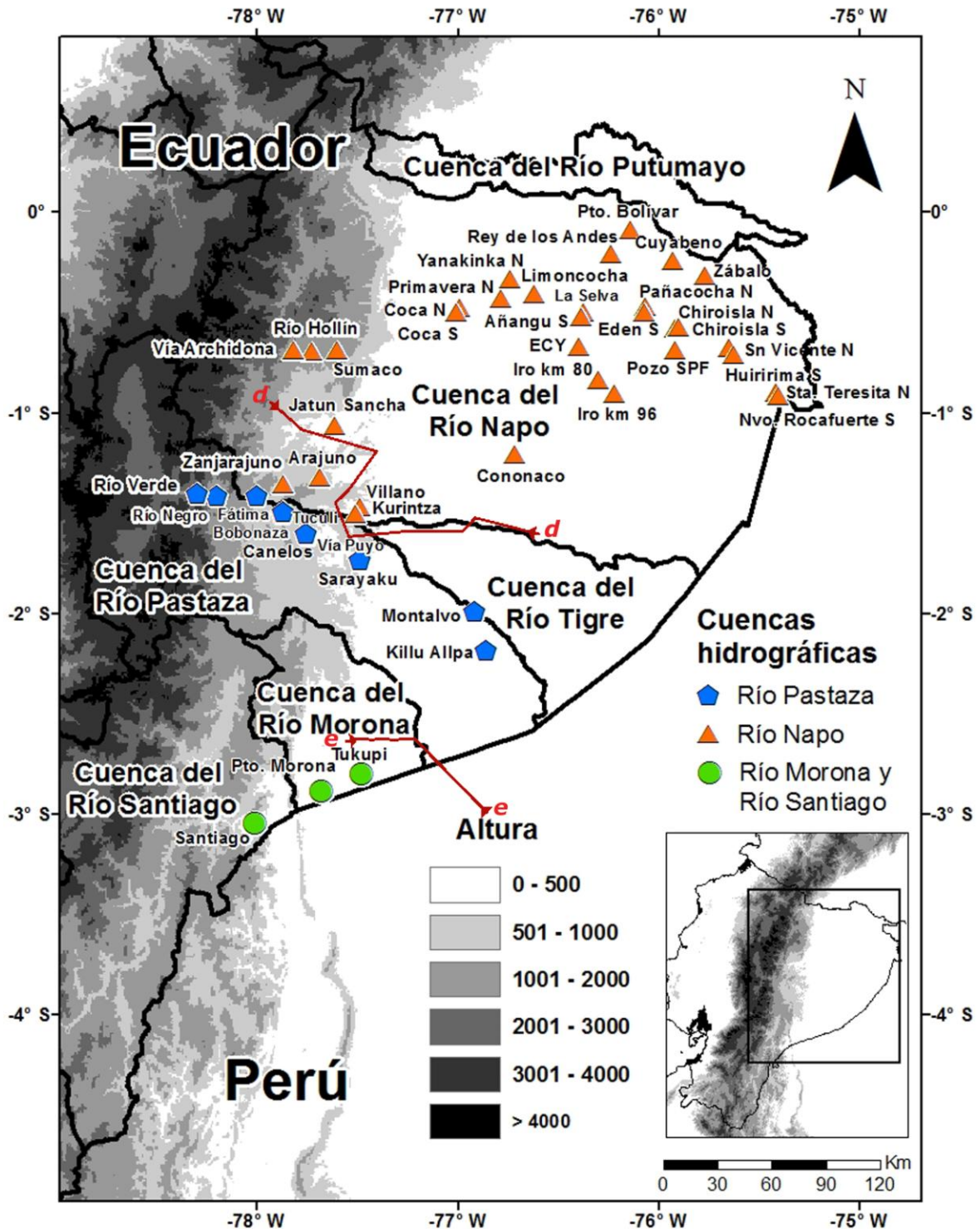


Figura 14. Barreras de discontinuidad genética en localidades de Ecuador para *Dendropsophus parviceps*. Se muestran los clados distribuidos por cuencas hidrográficas. Los colores corresponden a cada cuenca: Río Pastaza (azul), Río Napo (anaranjado), y ríos Morona y Santiago (verde).

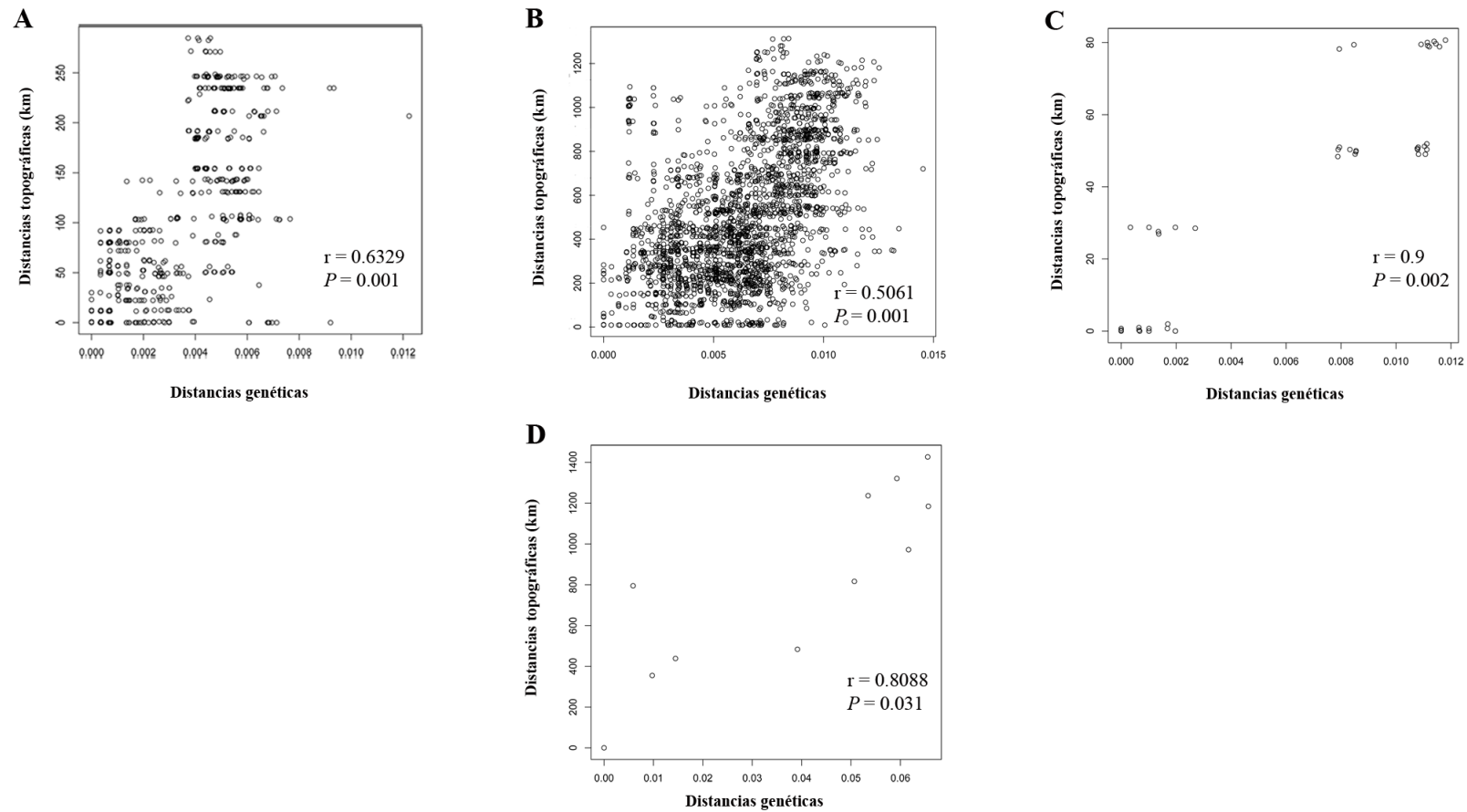


Figura 15. Correlación entre distancias genéticas p no corregidas (eje x) y distancias topográficas en kilómetros (eje y). (A) Clado Pastaza. (B) Clado Napo. (C) clado Morona-Santiago. (D) clado Perú. Los valores de r y P corresponden a la Tabla 5.

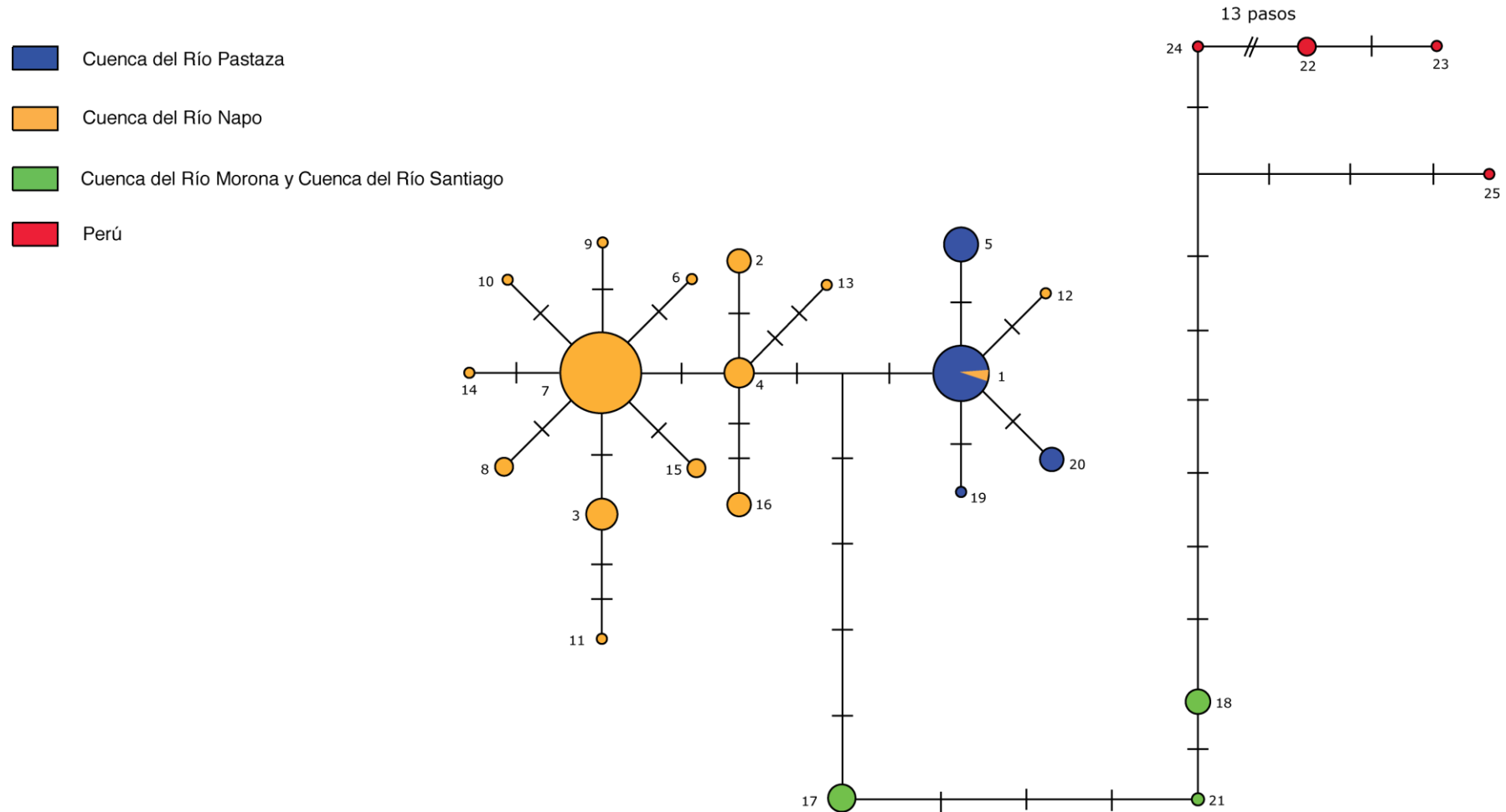


Figura 16. Red de haplotipos de 12S de *Dendropsophus parviceps*. Cada círculo representa un diferente haplotipo con tamaño proporcional a su frecuencia relativa. Las líneas en las ramas entre un haplotipo y otro representan el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Los números corresponden al número de haplotipo mostrado en el Anexo 7. Los colores de los haplotipos corresponden a su respectiva cuenca hidrográfica.

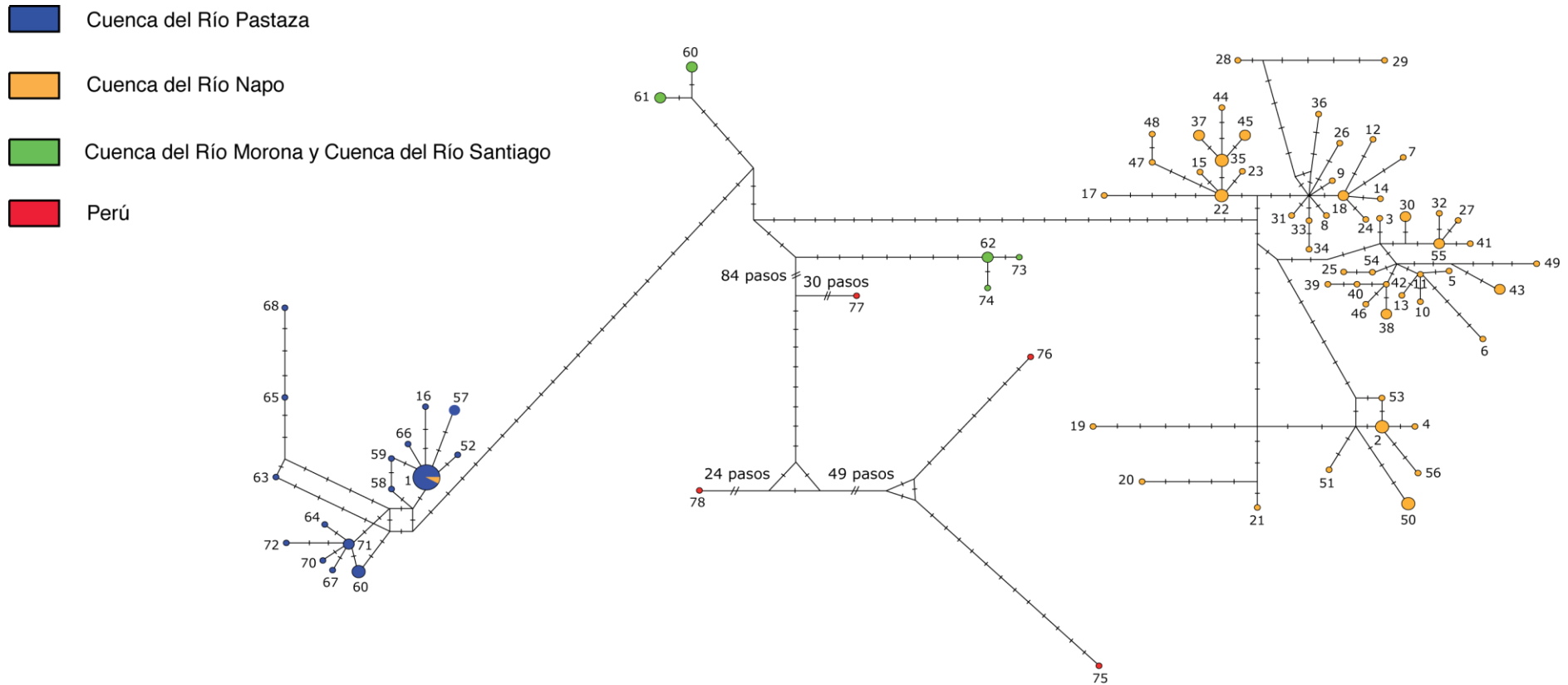


Figura 17. Red de haplotipos de ND1 de *Dendropsophus parviceps*. Cada círculo representa un diferente haplotipo con tamaño proporcional a su frecuencia relativa. Las líneas en las ramas entre un haplotipo y otro representan el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Los números corresponden al número de haplotipo mostrado en el Anexo 8. Los colores de los haplotipos corresponden a su respectiva cuenca hidrográfica.

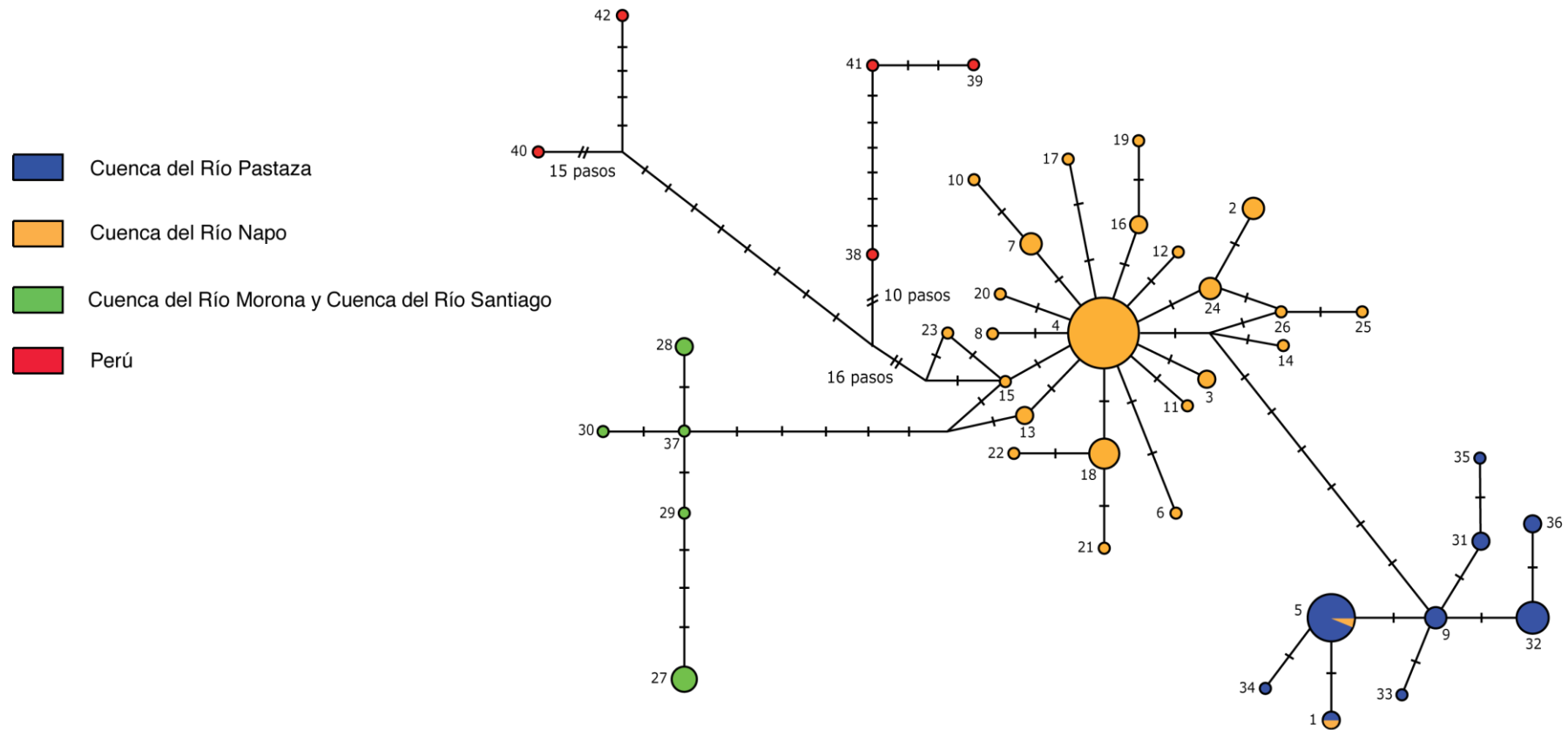


Figura 18. Red de haplotipos de CO1 de *Dendropsophus parviceps*. Cada círculo representa un diferente haplotipo con tamaño proporcional a su frecuencia relativa. Las líneas en las ramas entre un haplotipo y otro representan el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Los números corresponden al número de haplotipo mostrado en el Anexo 9. Los colores de los haplotipos corresponden a su respectiva cuenca hidrográfica.

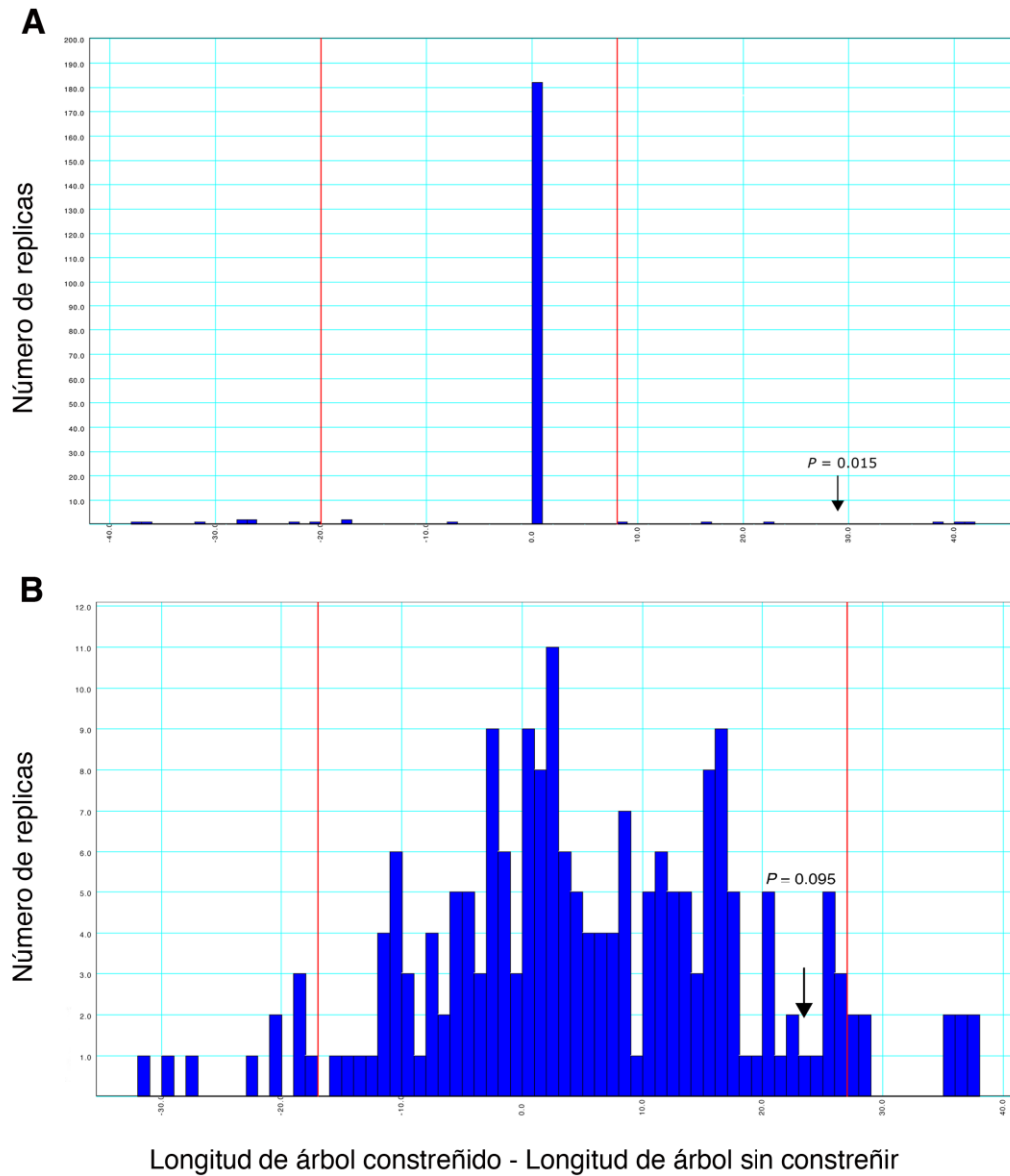
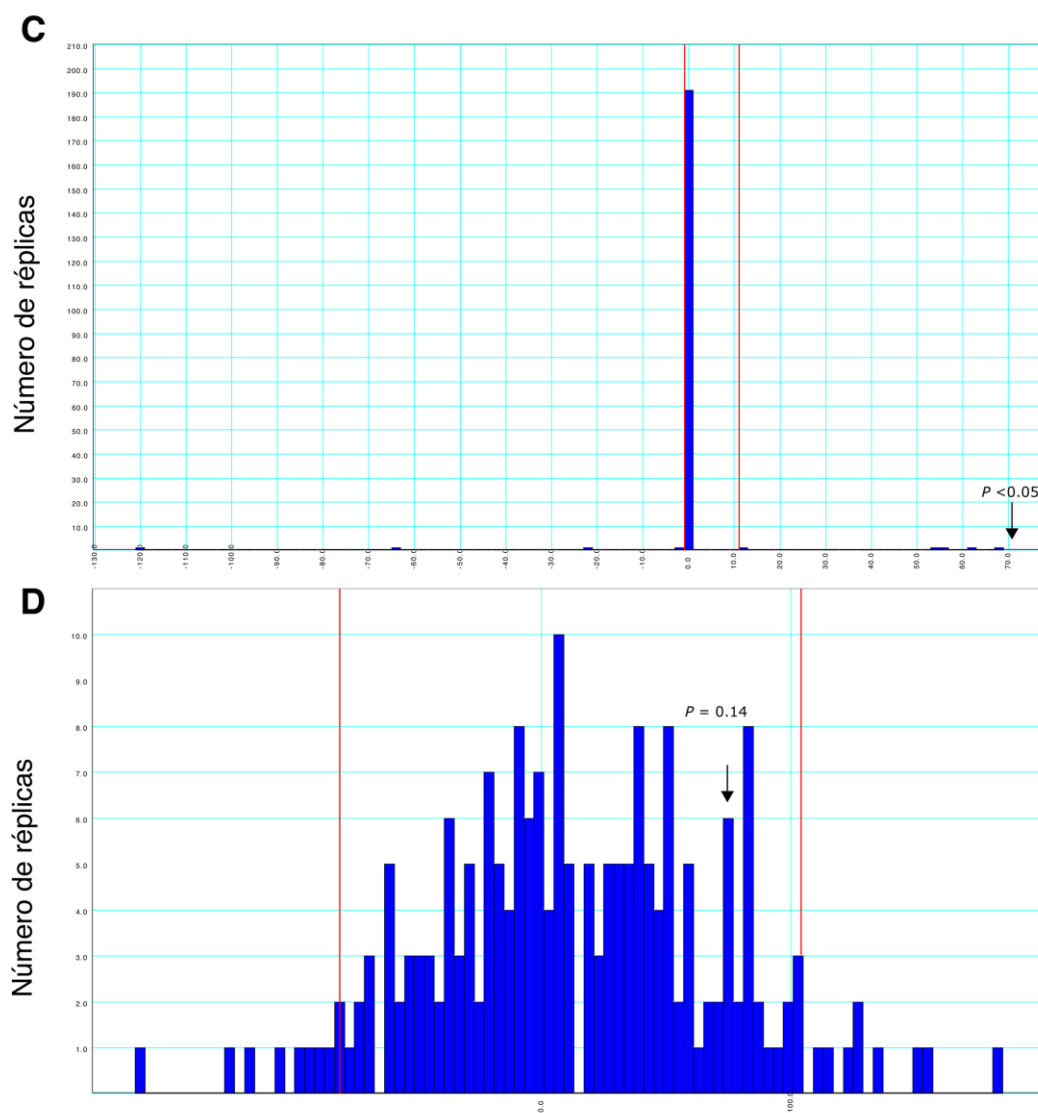


Figura 19. Resultados de las pruebas de bootstrap paramétrico para las hipótesis nulas entre poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. (A) Barreras fluviales; (B) Cuencas hidrográficas; (C) Zonas altitudinales bajas y altas; (D) Zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Napo y (E) Zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Pastaza. Las líneas rojas representan percentiles de 0.05 que marcan los extremos de la distribución. Los gráficos muestran la distribución de las diferencias en los pasos entre el árbol constreñido y el árbol sin constreñir para 200 réplicas. Las flechas señalan la diferencia real observada. La hipótesis nula fue rechazada si $P < 0.05$.



Longitud de árbol constreñido - Longitud de árbol sin constreñir

Figura 19. Continuación.

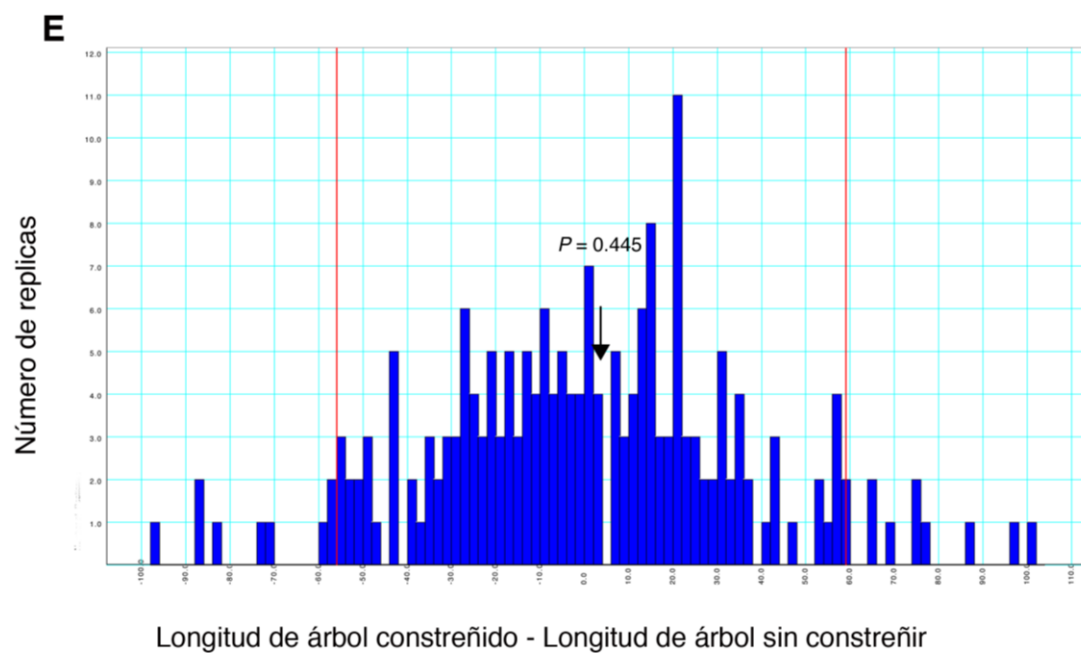


Figura 19. Continuación.

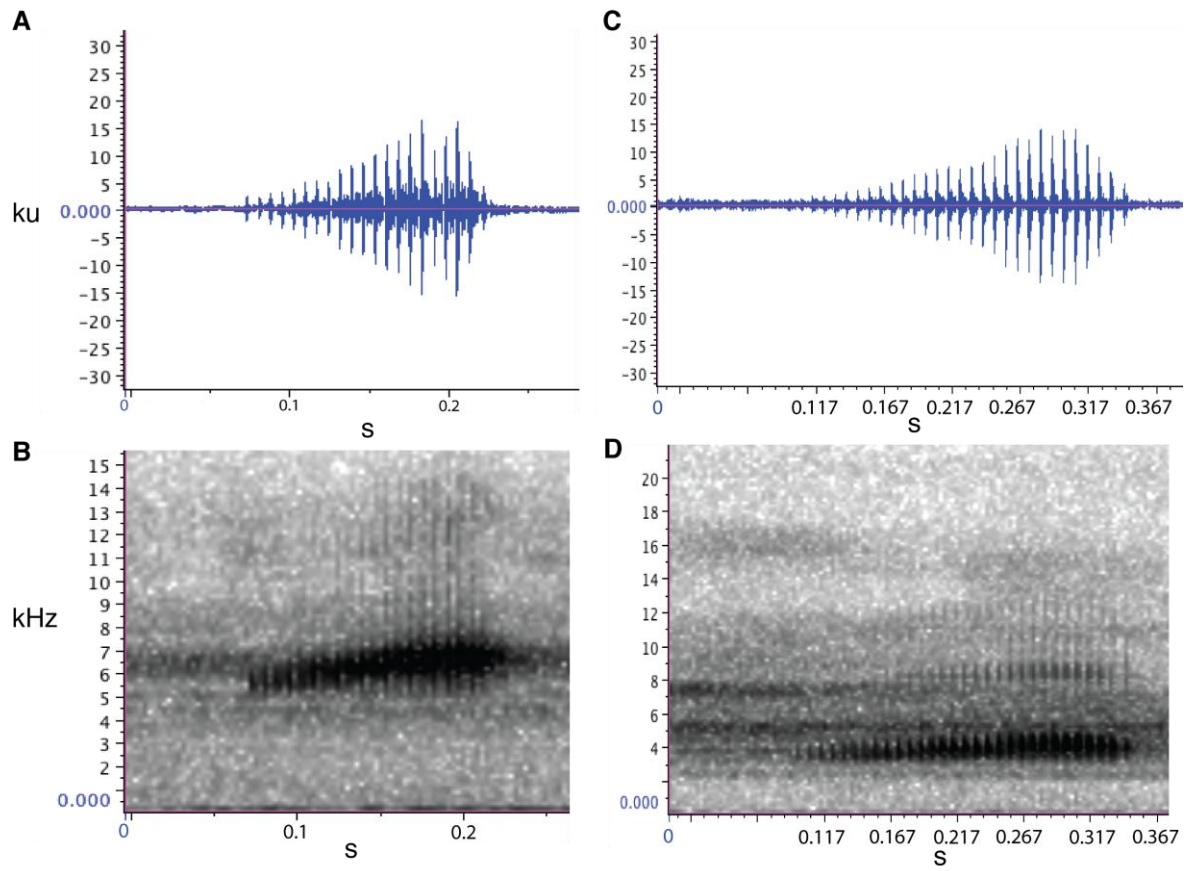


Figura 20. Cantos simples de *Dendropsophus parviceps*. (A–B) *D. parviceps* (QCAZ 52753) de Sarayaku, Pastaza, Ecuador. (C–D) *D. parviceps* (CORBIDI 08863) de Picota, Cordillera Azul, Perú. (A y C) Oscilogramas. (B y D) Espectrogramas.

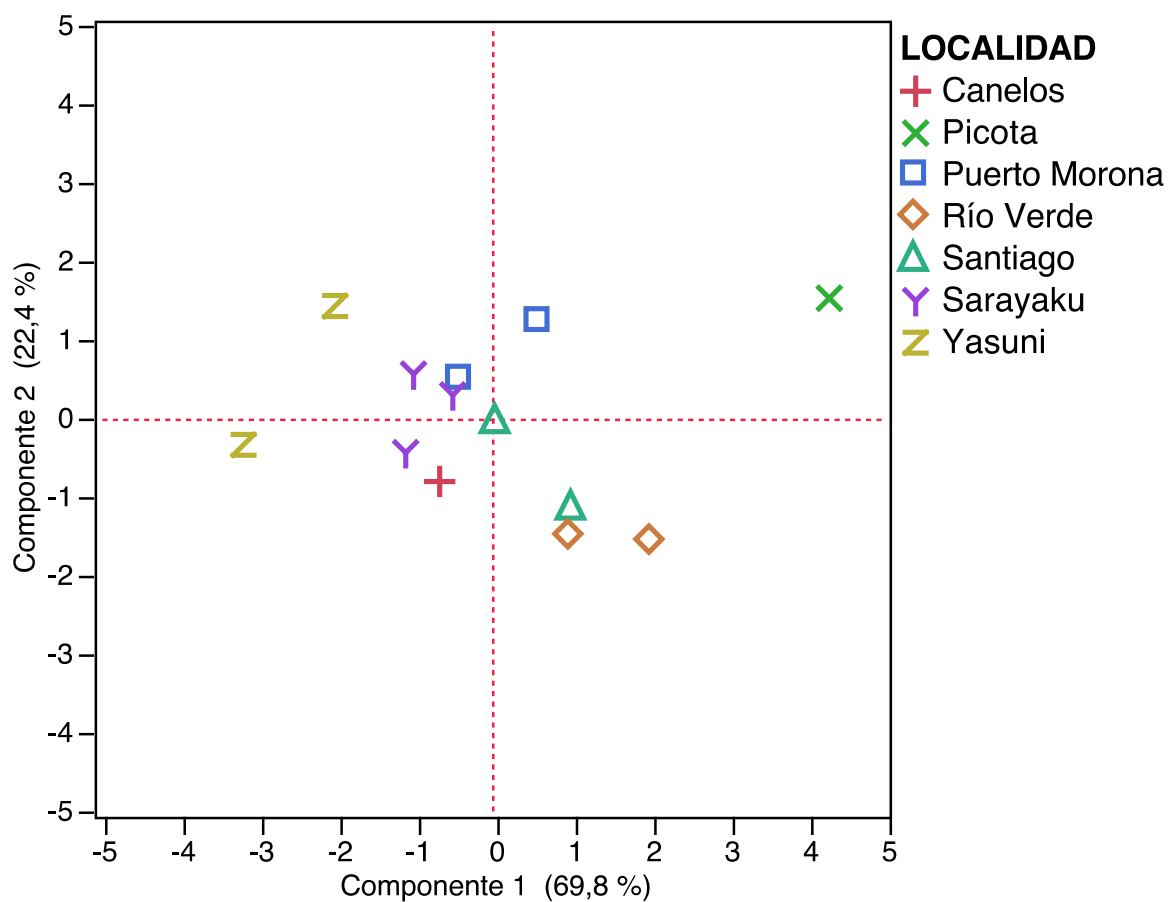


Figura 21. Eje I y II del Análisis de Componentes Principales basados en cinco variables bioacústicas de cantos simples para *Dendropsophus parviceps*. La contribución de cada eje al total de la variación es indicada en paréntesis.

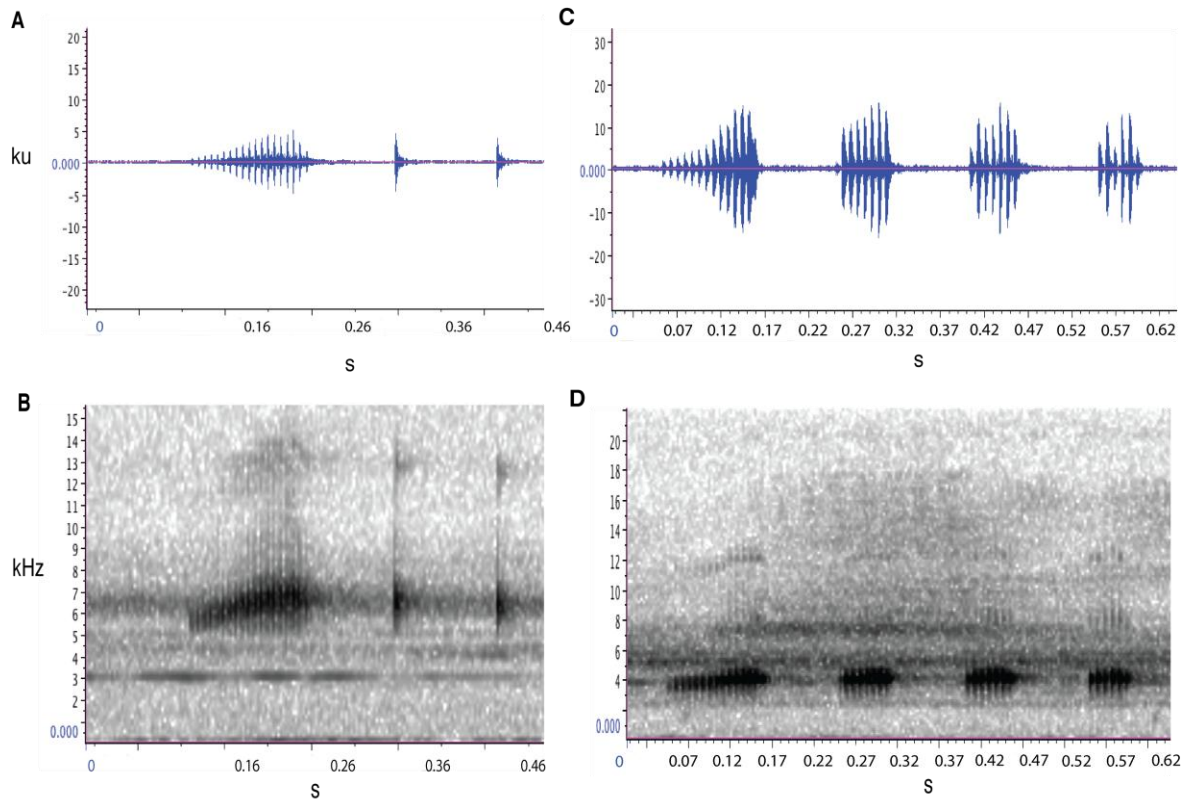


Figura 22. Cantos compuestos de *Dendropsophus parviceps*. (A–B) *D. parviceps* (QCAZ 52753) de Sarayaku, Pastaza, Ecuador. (C–D) *D. parviceps* (CORBIDI 08863) de Picota, Cordillera Azul, Perú. (A y C) Oscilogramas. (B y D) Espectrogramas.

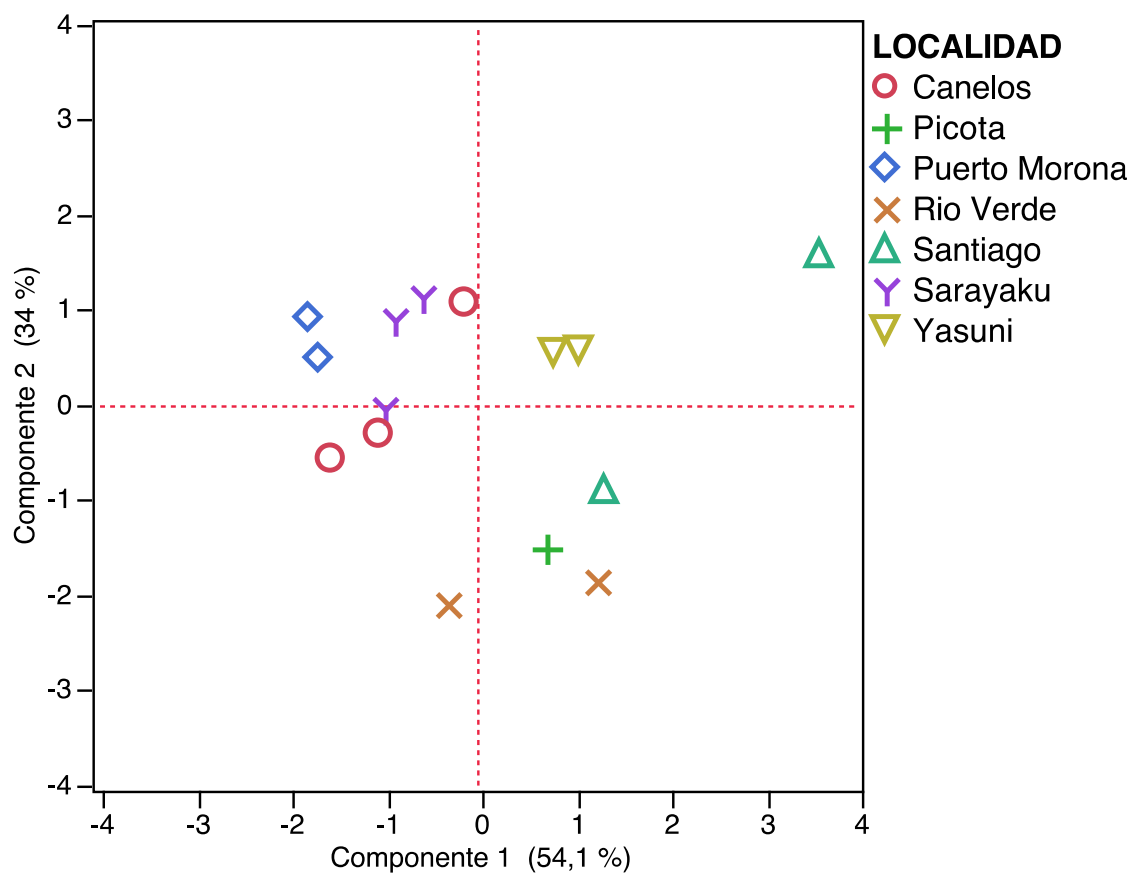


Figura 23. Eje I y II del Análisis de Componentes Principales basados en cuatro variables bioacústicas de cantos compuestos para *Dendropsophus parviceps*. La contribución de cada eje al total de la variación es indicada en paréntesis.

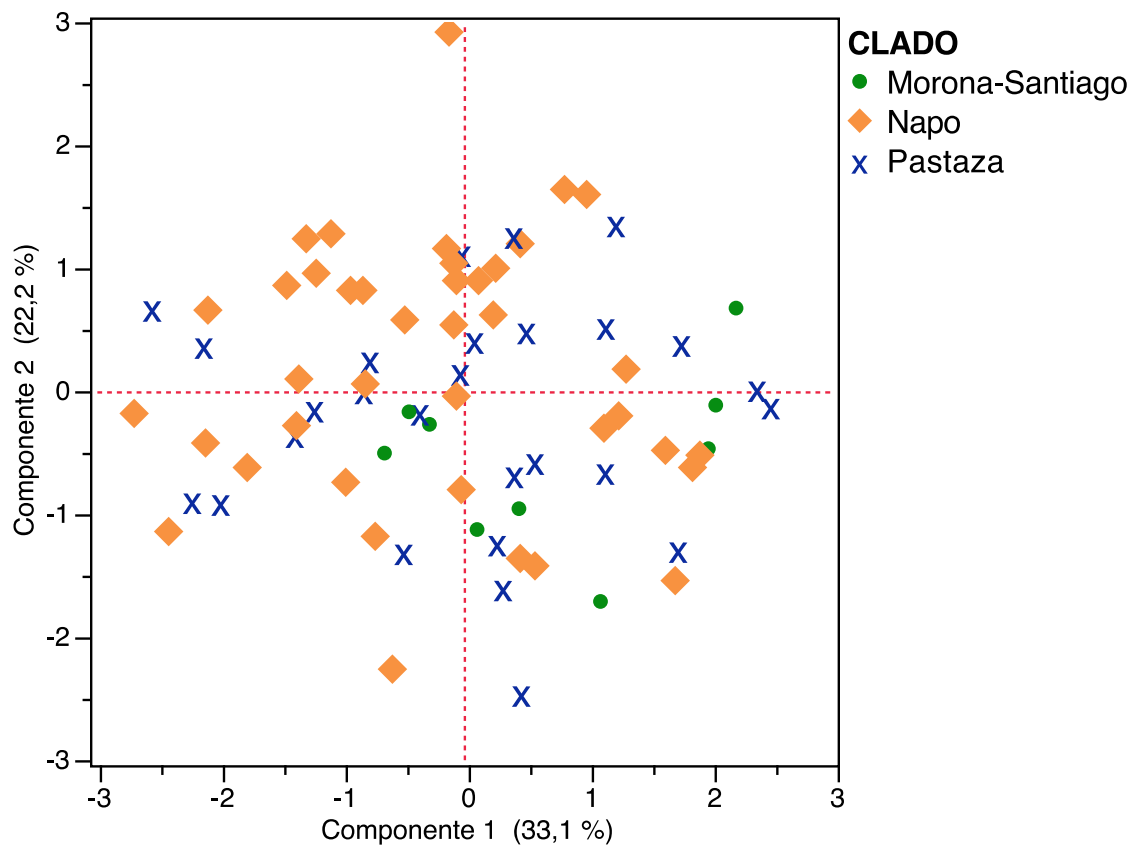


Figura 24. Componentes principales del análisis de cinco variables morfológicas de tamaño corregido para machos de *Dendropsophus parviceps*. La contribución de cada eje al total de la variación es indicada en paréntesis.

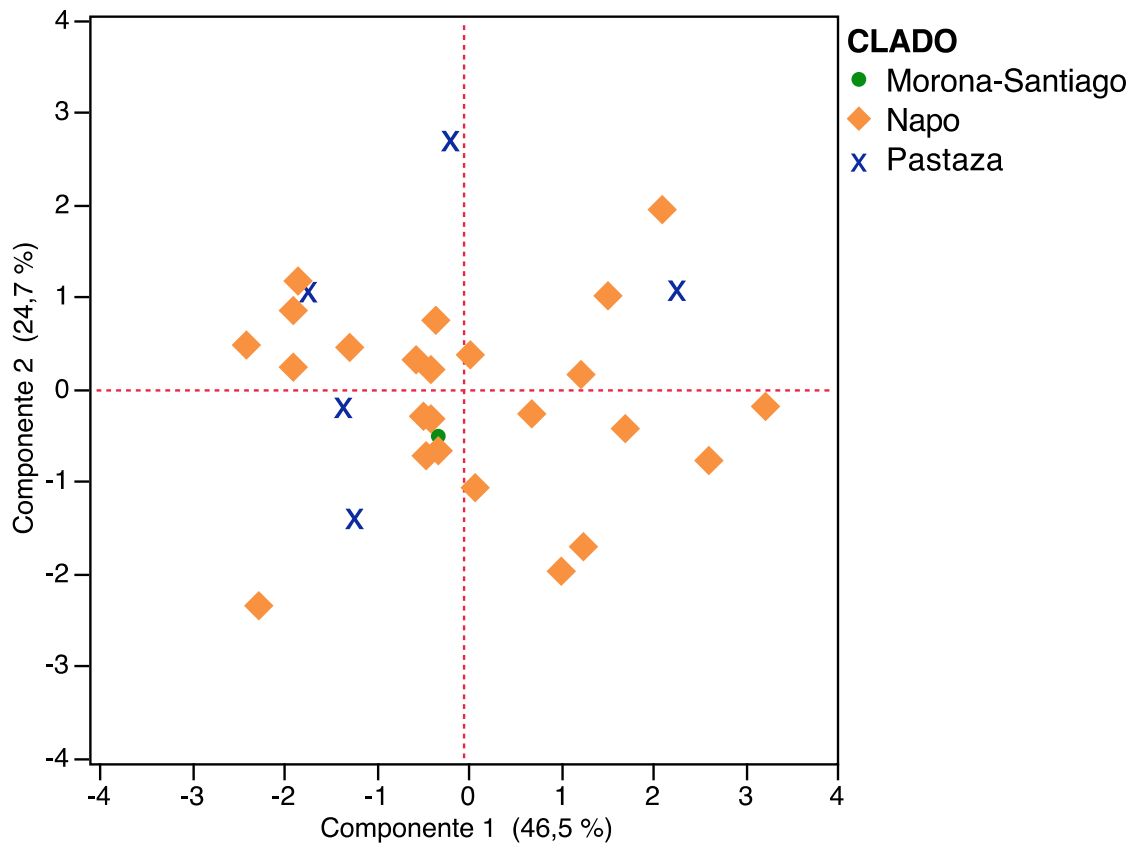


Figura 25. Componentes principales del análisis de cinco variables morfométricas de tamaño corregido para hembras de *Dendropsophus parviceps*. La contribución de cada eje al total de la variación es indicada en paréntesis.

9. TABLAS

Tabla 1. Genes y cebadores empleados en este estudio.

Gen	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Fuente	Dirección
12S	tPhe-frog	ATAGCRCTGAARAYGCTRAGATG	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Derecha
	tVal-frog	TGTAAGCGARAGGCTTTKGTTAAGCT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Reversa
ND1	16S-frog	TTACCCTRGGGATAACAGCGCAA	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Derecha
	WL384	GAGATWGTTTGWGCAACTGCTCG	Moen y Wiens, 2009	Reversa
	WL379b	GCACTAGCAATAATTATYTGAACBCC	Este estudio	Derecha
	tMet-frog	TTGGGGTATGGGCCCAAAAGCT	Wiens <i>et al.</i> (2005)	Reversa
COI	COI-BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	Hebert <i>et al.</i> (2004)	Derecha
	COI-BirdR2	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG	Hebert <i>et al.</i> (2004)	Reversa
	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al.</i> (1994)	Derecha
	dgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA	Folmer <i>et al.</i> (1994)	Reversa

Tabla 2. Variables bioacústicas de cantos de cortejo de *Dendropsophus parviceps* analizadas en este estudio.

Variable	Descripción
Nota	Unidad individual de sonido ya sea corto, simple o una serie larga de pulsos
Pulsos	Impulsos energéticos enfatizados en el espectro temporal de una nota
Clics	Notas secundarias del canto compuesto
Duración del canto	Tiempo desde el principio hasta el final del canto
Frecuencia dominante del canto	Frecuencia con la mayor energía a través del canto
Duración del primer componente del canto compuesto	Tiempo desde el principio hasta el final del primer componente
Duración del clic del canto compuesto	Tiempo desde el principio hasta el final del clic
Frecuencia dominante del primer componente	Frecuencia con la mayor energía a través del primer componente
Frecuencia dominante del clic	Frecuencia con la mayor energía a través del clic
Número de pulsos por nota	Número de pulsos en la nota
Tasa de pulsos por nota	Número de pulsos/duración de la nota
Tiempo de subida de la nota	Tiempo desde el inicio de la nota hasta el punto de su máxima amplitud
Tiempo de subida del clic	Tiempo desde el inicio del clic hasta el punto de su máxima amplitud
Intervalo entre el primer componente y el clic del canto compuesto	Tiempo desde la última nota del primer componente hasta el inicio de la primera de nota del clic

Tabla 3. Estrategias de partición y modelos de sustitución seleccionados para los análisis filogenéticos bajo el criterio BIC para *Dendropsophus parviceps*.

Partición	Mejor Modelo	Componentes
1	GTR + I + G	12S, 16S, tRNA
2	TvMef + I + G	ND1, 1 ^{era} posición
3	HKY + I + G	ND1, 2 ^{da} posición
4	TrN + I + G	ND1, 3 ^{era} posición
5	TrNef + I + G	CO1, 1 ^{era} posición
6	F81 + I	CO1, 2 ^{da} posición
7	TrN + G	CO1, 3 ^{era} posición

Tabla 4. Matriz de distancias genéticas (p no corregidas) de secuencias mitocondriales del gen 12S entre clados de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra el promedio, la desviación estándar y el rango entre paréntesis.

	Clado Pastaza	Clado Napo	Clado Morona-Santiago	Clado Perú
Clado Pastaza	0.001 ± 0.001 (0–0.004)			
Clado Napo	0.008 ± 0.002 (0.003–0.022)	0.002 ± 0.002 (0–0.018)		
Clado Morona-Santiago	0.01 ± 0.002 (0.007–0.014)	0.014 ± 0.003 (0.009–0.026)	0.003 ± 0.022 (0–0.006)	
Clado Perú	0.026 ± 0.007 (0.018–0.041)	0.032 ± 0.007 (0.022–0.058)	0.025 ± 0.007 (0.018–0.041)	0.021 ± 0.011 (0–0.035)

Tabla 5. Resultados de la prueba de Mantel para probar la correlación entre distancias genéticas y distancias topográficas intra y entre clados de *Dendropsophus parviceps*. r es el estadístico estandarizado de la prueba de Mantel equivalente a la correlación de Pearson. P fue estimado de 999 permutaciones. Resultados significativos ($P < 0.05$) están con negrita.

Clado	r	P
Clado Pastaza	0.6329	0.001
Clado Napo	0.5061	0.001
Clado Morona-Santiago	0.9	0.002
Clado Perú	0.8088	0.031

Tabla 6. Resultados de la diversidad haplotípica en cada gen y clado para poblaciones de *Dendropsophus parviceps* en Ecuador y Perú. *h* es el número de haplotipos; *Dh* es la diversidad haplotípica; π es la diversidad nucleotídica; y *s* el número de sitios polimórficos.

Gen	Clado	h	Dh	π	s
12S		25	0.8437	0.00792	37
	Pastaza	5	0.5704	0.00122	4
	Napo	13	0.6500	0.00225	15
	Morona-Santiago	4	0.7111	0.00285	5
	Perú	4	0.9000	0.01669	21
ND1		78	0.9848	0.02756	258
	Pastaza	16	0.8473	0.00343	28
	Napo	53	0.9917	0.00948	91
	Morona-Santiago	5	0.8929	0.00808	22
	Perú	4	1.0000	0.05398	133
CO1		42	0.9013	0.02498	68
	Pastaza	16	0.8689	0.00621	21
	Napo	73	0.7704	0.00465	24
	Morona-Santiago	6	0.8889	0.00877	12
	Perú	5	1.0000	0.06627	66

Tabla 7. Resultados de los análisis de los bootstrap paramétricos para probar cinco hipótesis biogeográficas: La hipótesis de barreras fluviales en el Río Napo, hipótesis de cuencas hidrográficas entre las cuencas del Napo y Pastaza, hipótesis de gradientes ambientales para todas las localidades y para las cuencas del Napo y Pastaza por separado. *P* es la probabilidad de observar la diferencia en el número de pasos entre el árbol constreñido y el árbol sin constreñir comparado con la distribución nula. La hipótesis nula fue rechazada si los valores son < 0.05 .

Hipótesis	Longitud del árbol		Diferencia observada	<i>P</i>
	Con constricción	Sin constricción		
Río Napo	713	684	29	0.015
Cuencas hidrográficas	739	715	24	0.095
Zonas altitudinales bajas y altas	914	842	72	< 0.05
Zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río Napo	1184	1109	75	0.140
Zonas altitudinales bajas y altas en la Cuenca del Río	849	845	4	0.445
Pastaza				

Tabla 8. Estadísticos descriptivos del canto simple de poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra el promedio, la desviación estándar, el rango entre paréntesis y el número de grabaciones (n) para cada población. Todas las frecuencias están en Hz y la duración en segundos.

Variable	Clado Pastaza			Clado Napo	Clado Morona-Santiago		Clado Perú
	Sarayaku (n = 3)	Canelos (n = 1)	Río Verde (n = 2)	Yasuní (n = 2)	Puerto Morona (n = 2)	Santiago (n = 2)	Picota (n = 1)
Duración del canto simple (s)	0.17 ± 0.02 (0.13–0.19)	0.17 ± 0.02 (0.16–0.20)	0.21 ± 0.03 (0.16–0.25)	0.13 ± 0.02 (0.11–0.16)	0.18 ± 0.03 (0.11–0.22)	0.18 ± 0.03 (0.07–0.21)	0.27
Frecuencia dominante (Hz)	6489.8 ± 177.75 (6115.4–6836.8)	6556.9 ± 260.76 (6169.3–6729.1)	5438.7 ± 199.92 (5264.9–5824.7)	6544.6 ± 343.6 (6018.5–6858.3)	6684.3 ± 211.4 (6384.3–6976.8)	5303.1 ± 191.34 (4877.3–5674)	3978.3
Número de pulsos por nota (U)	18.77 ± 3.47 (13–24)	16.75 ± 1.71 (15–19)	17.6 ± 1.90 (14–20)	16.43 ± 3.26 (12–20)	20.39 ± 3.31 (11–26)	18.62 ± 3.08 (7–22)	28.08
Tasa de pulsos por nota (U/s)	112 ± 11.52 (90.91–132.60)	96.69 ± 4.51 (92.6–103.3)	82.54 ± 4.27 (78.74–89.74)	126.78 ± 16.20 (102.56–142.86)	111.46 ± 12.88 (96.15–154.55)	106.67 ± 9.88 (84.91–122.6)	106.08
Tiempo de subida de la nota (s)	0.08 ± 0.01 (0.06–0.09)	0.09 ± 0.01 (0.08–0.098)	0.11 ± 0.015 (0.08–0.13)	0.07 ± 0.01 (0.06–0.08)	0.09 ± 0.02 (0.05–0.11)	0.08 ± 0.2 (0.04–0.11)	0.13

Tabla 9. Resultados de los Componentes Principales (CP) I–II de cinco variables bioacústicas para el canto simple de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra la carga, el eigenvalue y el porcentaje. Las cargas más altas están con negrita.

Variable	PC I	PC II
Tiempo de subida de la nota	0.52886	0.00959
Frecuencia dominante	-0.44608	0.05825
Número de pulsos	0.39146	0.63171
Tasa de pulsos	-0.29711	0.77293
Duración del canto	0.52896	0.00619
Eigenvalue	3.4914	1.1203
Porcentaje	69.828	22.406

Tabla 10. Resultados de la comparación de los valores de CP del canto simple basados en la prueba *t* de Student entre poblaciones de *Dendropsophus parviceps*.

Valores con negrita indican diferencias significativas.

Localidades		CP I (GL = 6)	CP II (GL = 6)
Picota	Yasuní	0.0001	0.2907
Picota	Sarayaku	0.0004	0.1344
Picota	Canelos	0.0014	0.0540
Picota	Puerto Morona	0.0015	0.4806
Río Verde	Yasuní	0.0007	0.0260
Picota	Santiago	0.0027	0.0489
Santiago	Yasuní	0.0026	0.1613
Picota	Río Verde	0.0106	0.0120
Puerto Morona	Yasuní	0.0057	0.6363
Río Verde	Sarayaku	0.0064	0.0415
Río Verde	Canelos	0.0318	0.4553
Canelos	Yasuní	0.0481	0.1604
Sarayaku	Yasuní	0.0249	0.5495
Río Verde	Puerto Morona	0.0665	0.0139
Santiago	Sarayaku	0.0508	0.3071
Santiago	Canelos	0.1712	0.7765
Río Verde	Santiago	0.1823	0.2284
Puerto Morona	Sarayaku	0.1532	0.2829
Puerto Morona	Canelos	0.3755	0.0914
Santiago	Puerto Morona	0.4925	0.0810
Canelos	Sarayaku	0.7907	0.2764

Tabla 11. Estadísticos descriptivos del canto compuesto de poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra el promedio, la desviación estándar, el rango entre paréntesis y el número de grabaciones (n) para cada población. El canto compuesto consiste de dos componentes, el primer componente es una nota introductoria como un zumbido y el segundo es un clic. Todas las frecuencias están en Hz y la duración en segundos.

Variables	Clado Pastaza			Clado Napo	Clado Morona-Santiago		Clado Perú
	Sarayaku (n =3)	Canelos (n = 3)	Río Verde (n = 2)	Yasuní (n= 2)	Puerto Morona (n = 2)	Santiago (n = 2)	Picota (n = 1)
Duración del canto compuesto (s)	0.45 ± 0.21 (0.27–0.9)	0.44 ± 0.20 (0.26–0.77)	0.61 ± 0.30 (0.36–1.22)	0.82 ± 0.41 (0.26–2.14)	0.32 ± 0.005 (0.31–0.32)	1.03 ± 0.41 (0.37–2.05)	0.54
Frecuencia dominante del canto compuesto (Hz)	6529 ± 169.4 (6352.3–6826)	6495.3 ± 137.6 (6341.5–6707.6)	5355.31 ± 76.16 (5286.4–5523.3)	6578.9 ± 231.3 (6761.4–6869.1)	6853.9 ± 22.84 (6836.8–6869.1)	5338.96 ± 241.65 (4920.3–5577.1)	4024.02
Duración del primer componente (s)	0.16 ± 0.04 (0.071–0.20)	0.14 ± 0.02 (0.12–0.16)	0.20 ± 0.048 (0.11–0.24)	0.11 ± 0.02 (0.07–0.15)	0.20 ± 0.0007 (0.19–0.20)	0.11 ± 0.04 (0.066–0.20)	0.14
Duración del clic (s)	0.05 ± 0.014 (0.030–0.076)	0.052 ± 0.015 (0.028–0.075)	0.051 ± 0.015 (0.03–0.083)	0.04 ± 0.01 (0.03–0.08)	0.066 ± 0.006 (0.062–0.071)	0.07 ± 0.01 (0.030–0.088)	0.07

Tabla 11. Continuación.

Variables	Clado Pastaza			Clado Napo	Clado Morona-Santiago		Clado Perú
	Sarayaku (n =3)	Canelos (n = 3)	Río Verde (n = 2)	Yasuní (n= 2)	Puerto Morona (n = 2)	Santiago (n = 2)	Picota (n = 1)
Frecuencia dominante del primer componente (Hz)	6549.3 ± 191.15 (6115.4–6826)	6438.4 ± 82.47 (6320–6589.2)	5315.5 ± 138.9 (5081.8–5512.5)	6502.1 ± 311.66 (5953.9–6869.1)	6847.5 ± 15.2 (6836.8–6858.3)	5290.2 ± 254.7 (4845–5663.2)	4024.02
Frecuencia dominante del clic (Hz)	6334.2 ± 151.8 (5964.7–6567.6)	6471.9 ± 194.8 (6190.8–6761.4)	5284.8 ± 109.5 (5415.6–4866.5)	6554.89 ± 216.68 (5997–7019.8)	6723.8 ± 114.20 (6643–6804.5)	5426.9 ± 195.03 (4931.1–5630.9)	4036.49
Número de pulsos del primer componente (U)	18.65 ± 3.82 (10–25)	15.71 ± 2.06 (14–19)	16 ± 4.57 (8–21)	17.13 ± 3.06 (10–21)	22 ± 1.41 (21–23)	10.35 ± 4.10 (5–20)	15
Tasa de pulsos por nota del primer componente (U/s)	121.8 ± 17.78 (96.26–170.73)	115.5 ± 6.81 (103.45–123.29)	79.54 ± 7.86 (65.57–94.24)	158.3 ± 21.46 (110–194.17)	110.8 ± 6.73 (106.06–115.58)	95.55 ± 14.59 (69.77–136.36)	103.82

Tabla 11. Continuación.

Variables	Clado Pastaza			Clado Napo	Clado Morona-Santiago		Clado Perú
	Sarayaku (n =3)	Canelos (n = 3)	Río Verde (n = 2)	Yasuní (n= 2)	Puerto Morona (n = 2)	Santiago (n = 2)	Picota (n = 1)
Tiempo de subida del primer componente (s)	0.078 ± 0.018 (0.035–0.098)	0.07 ± 0.01 (0.06–0.082)	0.10 ± 0.02 (0.054–0.12)	0.06 ± 0.01 (0.04–0.08)	0.10	0.05 ± 0.02 (0.03–0.10)	0.073
Tiempo de subida del clic (s)	0.024 ± 0.007 (0.015–0.038)	0.026 ± 0.008 (0.014–0.038)	0.025 ± 0.008 (0.015–0.042)	0.02 ± 0.005 (0.013–0.039)	0.033 ± 0.003 (0.031–0.035)	0.03 ± 0.006 (0.015–0.044)	0.038
Intervalo entre el primer componente y el clic (s)	0.06 ± 0.02 (0.03–0.09)	0.06 ± 0.02 (0.05–0.10)	0.11 ± 0.02 (0.09–0.15)	0.08 ± 0.015 (0.04–0.11)	0.049 ± 0.009 (0.042–0.055)	0.07 ± 0.02 (0.04–0.11)	0.069

Tabla 12. Resultados de los Componentes Principales (CP) I–II de cuatro variables bioacústicas para el canto compuesto de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra la carga, el eingevalue y el porcentaje. Las cargas más altas están con negrita.

Variable	PCI	PCII
Tiempo de subida del canto	0.64605	0.25643
Frecuencia dominante	-0.37363	0.57071
Intervalo entre el primer componente y el clic	0.16103	-0.73644
Duración del canto	0.64583	0.25728
Eingevalue	2.1623	1.3611
Porcentaje	54.058	34.027

Tabla 13. Resultados de la comparación de los valores de CP del canto compuesto basados en la prueba *t* de Student entre poblaciones de *Dendropsophus parviceps*. Valores con negrita indican diferencias significativas.

Localidades		CP I (GL = 6)	CP II (GL = 6)
Santiago	Puerto Morona	0.0007	0.6829
Santiago	Canelos	0.0016	0.7181
Santiago	Sarayaku	0.0020	0.7247
Yasuní	Puerto Morona	0.0097	0.8671
Picota	Puerto Morona	0.0330	0.0583
Río Verde	Puerto Morona	0.0230	0.0114
Santiago	Río Verde	0.0364	0.0217
Yasuní	Canelos	0.0332	0.5345
Yasuní	Sarayaku	0.0440	0.9306
Santiago	Picota	0.1151	0.0998
Picota	Canelos	0.1036	0.1318
Picota	Sarayaku	0.1287	0.0535
Santiago	Yasuní	0.0882	0.8081
Río Verde	Canelos	0.0877	0.0254
Río Verde	Sarayaku	0.1156	0.0083
Sarayaku	Puerto Morona	0.2274	0.9232
Canelos	Puerto Morona	0.2924	0.4262
Yasuní	Río Verde	0.5850	0.0148
Picota	Río Verde	0.7851	0.6575
Yasuní	Picota	0.8597	0.0727
Sarayaku	Canelos	0.8452	0.4327

Tabla 14. Estadísticos descriptivos para medidas morfométricas de clados de *Dendropsophus parviceps* usados en los Análisis de Componentes Principales. Se muestra el promedio, la desviación estándar, el rango entre paréntesis y el número de individuos (n). Abreviaciones son **LRC** = longitud rostro-cloacal; **LC** = longitud de la cabeza; **AC** = ancho de la cabeza; **LF** = longitud del fémur; **LT** = longitud de la tibia; **LP** = longitud del pie. Todas las medidas están en mm.

	LRC	LC	AC	LF	LT	LP
Clado Pastaza	16.37 ± 0.89	4.85 ± 0.31	5.15 ± 0.30	7.78 ± 0.50	8.63 ± 0.47	6.58 ± 0.47
Machos (n = 27)	(14.29–18.08)	(4.28–5.34)	(4.66–5.87)	(6.67–8.92)	(7.73–9.54)	(5.39–7.44)
Hembras (n = 6)	22.27 ± 1.71 (20.47–24.35)	5.94 ± 0.60 (5.37–7.02)	6.74 ± 0.63 (6.16–7.43)	10.92 ± 0.43 (10.53–11.68)	11.70 ± 1.01 (10.73–13.43)	9.23 ± 1.05 (7.71–10.65)
Clado Napo	16.46 ± 0.82	4.98 ± 0.33	5.19 ± 0.28	7.78 ± 0.47	8.59 ± 0.45	6.49 ± 0.48
Machos (n = 41)	(14.60–18.70)	(4.25–5.77)	(4.57–5.77)	(6.65–8.77)	(7.22–9.62)	(5.65–7.30)
Hembras (n = 24)	22.64 ± 1.16 (20.34–25.52)	6.02 ± 0.34 (5.35–6.63)	6.80 ± 0.21 (6.45–7.37)	11.26 ± 0.67 (10.01–12.63)	12.25 ± 0.58 (11.15–13.49)	9.11 ± 0.85 (7.31–10.44)
Clado Morona-Santiago	16.63 ± 0.76	4.81 ± 0.18	5.26 ± 0.30	7.73 ± 0.45	9.05 ± 0.49	6.83 ± 0.44
Machos (n = 9)	(15.42–17.76)	(4.54–5.09)	(4.76–5.70)	(6.96–8.35)	(8.42–9.85)	(6.42–7.68)
Hembra (n = 1)	24.16	6.22	6.76	11.63	12.65	10.23

Tabla 15. Resultados de los Componentes Principales (CP) I–II para cinco variables morfométricas de adultos de *Dendropsophus parviceps*. Se muestra la carga, el eingevalue y el porcentaje. Las cargas más altas están con negrita.

Variable	ACP machos (n = 77)		ACP hembras (n = 31)	
	CPI	CPII	CPI	CPII
Longitud de la cabeza	0.00568	0.70915	0.45826	0.22259
Ancho de la cabeza	0.20400	0.66177	0.30343	0.66516
Longitud del fémur	0.57907	0.07461	0.49062	-0.48170
Longitud de la tibia	0.54775	-0.17288	0.47849	-0.43506
Longitud del pie	0.56832	-0.15402	0.47778	0.29444
Eingevalue	1.6537	1.1088	2.3244	1.2348
Porcentaje	33.074	22.175	46.487	24.695

10. ANEXOS

Anexo 1. Lista de especímenes muestreados en este estudio incluyendo el número QCAZ, país, provincia, localidad, altitud, coordenadas geográficas y los genes que fueron amplificados para cada espécimen.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
27983	Ecuador	Sucumbíos	Zábalo	220	-0.318133	-75.766250	X	X	X
27995	Ecuador	Sucumbíos	Zábalo	220	-0.318133	-75.766250	X	X	X
28003	Ecuador	Sucumbíos	Zábalo	220	-0.318133	-75.766250	X	X	X
28247	Ecuador	Sucumbíos	Puerto Bolívar	240	-0.088600	-76.142033	X	X	X
28249	Ecuador	Sucumbíos	Puerto Bolívar	240	-0.088600	-76.142033	X	X	X
28269	Ecuador	Sucumbíos	Playas de Cuyabeno	230	-0.241517	-75.930533	X	X	X
28399	Ecuador	Sucumbíos	Playas de Cuyabeno	230	-0.241517	-75.930533	X	X	X
28302	Ecuador	Sucumbíos	Rey de los Andes	270	-0.208222	-76.236861	X	X	X
28455	Ecuador	Sucumbíos	Rey de los Andes	270	-0.208222	-76.236861	X	X	X
28492	Ecuador	Sucumbíos	Rey de los Andes	270	-0.208222	-76.236861	X	X	X
43074	Ecuador	Sucumbíos	Reserva Limoncocha	261	-0.406240	-76.619480	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
43103	Ecuador	Sucumbíos	Reserva Limoncocha	261	-0.406240	-76.619480	X	X	X
43140	Ecuador	Sucumbíos	Reserva Limoncocha	261	-0.406240	-76.619480	X	X	X
44915	Ecuador	Sucumbíos	Reserva Limoncocha	261	-0.406240	-76.619480	X	X	X
44140	Ecuador	Sucumbíos	Río Napo, Pañacocha, Banco norte	225	-0.471200	-76.066700	X	X	X
44055	Ecuador	Sucumbíos	La Selva Lodge	229	-0.508680	-76.364930	X	X	X
47736	Ecuador	Sucumbíos	La Selva	226	-0.498167	-76.373833	X	X	X
17942	Ecuador	Napo	Río Hollín	1068	-0.695833	-77.730278	X	X	X
22208	Ecuador	Napo	Río Hollín	1068	-0.695833	-77.730278	X	X	X
18177	Ecuador	Napo	Estación Biológica Jatun Sacha	397	-1.065050	-77.614183	X	X	X
18184	Ecuador	Napo	Estación Biológica Jatun Sacha	397	-1.065050	-77.614183	X		
48919	Ecuador	Napo	Sumaco	1430	-0.686590	-77.601330	X	X	X
48929	Ecuador	Napo	Sumaco	1430	-0.686590	-77.601330	X	X	X
48930	Ecuador	Napo	Sumaco	1430	-0.686590	-77.601330	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
48931	Ecuador	Napo	Sumaco	1430	-0.686590	-77.601330	X	X	X
51802	Ecuador	Napo	21 km al sureste de Cosanga, vía Archidona	1320	-0.691040	-77.820860	X	X	X
51803	Ecuador	Napo	21 km al sureste de Cosanga, vía Archidona	1320	-0.691040	-77.820860	X	X	X
51807	Ecuador	Napo	21 km al sureste de Cosanga, vía Archidona	1320	-0.691040	-77.820860	X	X	X
37692	Ecuador	Orellana	Cooperativa Unión Lojana, Bloque 15 Yanakinka norte		-0.337359	-76.738561	X	X	X
43679	Ecuador	Orellana	Coca, Banco norte	267	-0.477820	-76.989820	X	X	X
43680	Ecuador	Orellana	Coca, Banco norte	267	-0.477820	-76.989820	X	X	X
43704	Ecuador	Orellana	Coca, Banco norte	267	-0.477820	-76.989820	X	X	X
43775	Ecuador	Orellana	Coca, Banco sur	264	-0.498950	-77.007550	X	X	X
43892	Ecuador	Orellana	Río Napo, Primavera, Banco norte	244	-0.431000	-76.786480	X	X	X
43969	Ecuador	Orellana	Río Napo, Áñangu, Banco sur	255	-0.524920	-76.384450	X	X	X
43968	Ecuador	Orellana	Río Napo, Áñangu, Banco sur	255	-0.524920	-76.384450	X	X	X
44227	Ecuador	Orellana	Río Napo, Edén, Banco sur	216	-0.498330	-76.071120	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
44228	Ecuador	Orellana	Río Napo, Edén, Banco sur	216	-0.498330	-76.071120	X	X	X
44229	Ecuador	Orellana	Río Napo, Edén, Banco sur	216	-0.498330	-76.071120	X	X	X
44355	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco sur	207	-0.579970	-75.917690	X	X	X
44356	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco sur	207	-0.579970	-75.917690	X	X	X
44357	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco sur	207	-0.579970	-75.917690	X	X	X
44440	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco norte	203	-0.575650	-75.899828	X	X	X
44441	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco norte	203	-0.575650	-75.899828	X	X	X
44442	Ecuador	Orellana	Río Napo, Chiroisla, Banco norte	203	-0.575650	-75.899828	X	X	X
44492	Ecuador	Orellana	Río Napo, San Vicente, Banco norte	196	-0.679010	-75.651120	X	X	X
44493	Ecuador	Orellana	Río Napo, San Vicente, Banco norte	196	-0.679010	-75.651120	X	X	X
44494	Ecuador	Orellana	Río Napo, San Vicente, Banco norte	196	-0.679010	-75.651120	X	X	X
44599	Ecuador	Orellana	Río Napo, Huiririma, Banco sur	194	-0.711630	-75.623950	X	X	X
44600	Ecuador	Orellana	Río Napo, Huiririma, Banco sur	194	-0.711630	-75.623950	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
44601	Ecuador	Orellana	Río Napo, Huiririma, Banco sur	194	-0.711630	-75.623950	X	X	X
44734	Ecuador	Orellana	Río Napo, Santa Teresita, Banco norte	186	-0.900870	-75.413570	X	X	X
44735	Ecuador	Orellana	Río Napo, Santa Teresita, Banco norte	186	-0.900870	-75.413570	X	X	X
44736	Ecuador	Orellana	Río Napo, Santa Teresita, Banco norte	186	-0.900870	-75.413570	X	X	X
44775	Ecuador	Orellana	Río Napo, Nuevo Rocafuerte, Banco sur	187	-0.919270	-75.401030	X	X	X
44776	Ecuador	Orellana	Río Napo, Nuevo Rocafuerte, Banco sur	187	-0.919270	-75.401030	X	X	X
44778	Ecuador	Orellana	Río Napo, Nuevo Rocafuerte, Banco sur	187	-0.919270	-75.401030	X	X	X
31267	Ecuador	Orellana	PNY, Pozo SPF, a 8 km del Pozo	250	-0.691577	-75.919596	X	X	X
43066	Ecuador	Orellana	PNY, km 80–75 vía Pompeya-Iro	250	-0.840118	-76.302406	X	X	X
43067	Ecuador	Orellana	PNY, km 80–75 vía Pompeya-Iro	250	-0.840118	-76.302406	X	X	X
35720	Ecuador	Orellana	PNY, Estación Científica Yasuní, PUCE	250	-0.674370	-76.397050	X	X	X
51075	Ecuador	Orellana	PNY, Estación Científica Yasuní, PUCE	250	-0.674370	-76.397050	X	X	X
51229	Ecuador	Orellana	PNY, Estación Científica Yasuní, PUCE	250	-0.674370	-76.397050	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
51230	Ecuador	Orellana	PNY, Estación Científica Yasuní, PUCE	250	-0.674370	-76.397050	X	X	X
51195	Ecuador	Orellana	PNY, km 96 vía Pompeya-Iro	233	-0.906500	-76.221410	X	X	X
38332	Ecuador	Pastaza	Arajuno	580	-1.324330	-77.689000	X	X	X
38676	Ecuador	Pastaza	Alrededores de Villano, K4 Unidad 3		-1.470618	-77.486877	X	X	X
38948	Ecuador	Pastaza	Alrededores de Villano, Comunidad Kurintza, Unidad 1	362	-1.507770	-77.511660	X	X	X
39515	Ecuador	Pastaza	Bataburo Lodge, Cononaco	220	-1.208330	-76.716660	X	X	X
49314	Ecuador	Pastaza	Zanjarajuno	977	-1.357222	-77.870556	X		X
49340	Ecuador	Pastaza	Zanjarajuno	977	-1.357222	-77.870556	X	X	X
15424	Ecuador	Pastaza	Fátima	1023	-1.411389	-78.000000	X	X	X
49334	Ecuador	Pastaza	Fátima	1023	-1.411389	-78.000000	X	X	X
52751	Ecuador	Pastaza	Sarayaku, Sendero al Río Palandayaku	325	-1.735500	-77.490180	X	X	X
52752	Ecuador	Pastaza	Sarayaku, Sendero al Río Palandayaku	325	-1.735500	-77.490180	X	X	X
52753	Ecuador	Pastaza	Sarayaku, Sendero al Río Palandayaku	325	-1.735500	-77.490180	X		X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
52755	Ecuador	Pastaza	Sarayaku, Sendero al Río Palandayaku	325	-1.735500	-77.490180	X	X	X
52816	Ecuador	Pastaza	Canelos, Hostería Huella Verde	465	-1.606550	-77.753630	X	X	X
52820	Ecuador	Pastaza	Canelos, Hostería Huella Verde	465	-1.606550	-77.753630	X	X	X
52837	Ecuador	Pastaza	Canelos, vía Canelos-Puyo	465	-1.601620	-77.757640	X	X	X
52838	Ecuador	Pastaza	Canelos, vía Canelos-Puyo	465	-1.601620	-77.757640	X	X	X
52892	Ecuador	Pastaza	Comunidad Killu Allpa	335	-2.187117	-76.857681	X	X	X
53161	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
53165	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
53166	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
53167	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
53181	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838		X	X
53182	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
53183	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
53184	Ecuador	Pastaza	Comunidad Campus, Parroquia Montalvo	392	-1.992436	-76.916838	X	X	X
32491	Ecuador	Pastaza	900 m sureste de Bobonaza	660	-1.498099	-77.879310	X	X	X
32543	Ecuador	Pastaza	Bobonaza, vía Tuculí	620	-1.494543	-77.869654	X	X	X
32555	Ecuador	Pastaza	Bobonaza, vía Tuculí	620	-1.494543	-77.869654	X	X	X
52023	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X	X	X
52024	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X		X
52026	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X	X	X
51949	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X	X	X
52028	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X		X
52021	Ecuador	Tungurahua	Río Negro	1244	-1.412520	-78.204250	X	X	X
52017	Ecuador	Tungurahua	Río Verde	1600	-1.400140	-78.300630	X	X	X
52018	Ecuador	Tungurahua	Río Verde	1600	-1.400140	-78.300630	X	X	X
52019	Ecuador	Tungurahua	Río Verde	1600	-1.400140	-78.300630	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
24425	Ecuador	Tungurahua	Río Verde	1600	-1.400140	-78.300630	X	X	X
24427	Ecuador	Tungurahua	Río Verde	1600	-1.400140	-78.300630	X	X	X
52540	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Payapas-Santiago entre km 83 y km 85	300	-3.046550	-78.015560	X	X	X
52541	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Payapas-Santiago entre km 83 y km 85	300	-3.046550	-78.015560	X	X	X
52542	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Payapas-Santiago entre km 83 y km 85	300	-3.046550	-78.015560	X	X	X
52572	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Payapas-Santiago entre km 83 y km 85	300	-3.046550	-78.015560	X	X	X
52535	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Payapas-Santiago entre km 83 y km 85	300	-3.046550	-78.015560	X		X
52617	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Puerto Morona-San José de Morona, km 156-174	208	-2.888610	-77.681570	X	X	X
52618	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Puerto Morona-San José de Morona, km 156-174	208	-2.888610	-77.681570	X		X
52619	Ecuador	Morona Santiago	Carretera Puerto Morona-San José de Morona, km 156-174	208	-2.888610	-77.681570	X	X	X
53266	Ecuador	Morona Santiago	Tukupi	246	-2.800453	-77.481811	X	X	X
53294	Ecuador	Morona Santiago	Tukupi	246	-2.800453	-77.481811	X	X	X
50954	Perú	Madre de Dios	Tambopata, La Habana, Puerto Maldonado	192	-12.653728	-69.179575	X	X	X

Anexo 1. Continuación.

QCAZ	País	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	12S	ND1	CO1
50962	Perú	Loreto	Requena, Jenaro Herrera	140	-4.908022	-73.666859	X	X	X
50956	Perú	Cusco	La Convención, KP 59	670	-12.258083	-72.842472	X	X	X
50967	Perú	Cusco	La Convención, KP 55	1144	-12.222249	-73.008579	X		X
50973	Perú	San Martín	Picota, Área de Conservación Municipal Chambira	679	-7.037472	-76.090028	X	X	X

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN con Tiocianato de Guanidina.**Lisis celular**

1. Calentar la solución de lisis a 55°C hasta que el precipitado vuelva a estar en solución.
2. Colocar 10 mg de tejido macerado en un tubo de 1.5ml que contenga 300µl de la solución de lisis de células.
3. Añadir 3–5µl de Proteinasa K (20mg/ml) al tejido, dar un vórtex rápido e incubar de 3–6 horas (dejarlo durante toda la noche si fuera necesario) a 55°C hasta que el tejido se haya digerido.
4. Durante el proceso de lisis, las muestras deben ser agitadas por lo menos cada 30 minutos.
5. Dar un vórtex suave para homogenizar.
6. Enfriar las muestras a temperatura ambiente.

Precipitación proteica

1. Añadir 100µl de Solución de Precipitación de Proteínas en cada tubo con células lisadas y dar un vórtex de 10–20 segundos para mezclar el contenido.
2. Centrifugar a una velocidad de 13000 rpm durante 10 minutos.
3. Trasladar el sobrenadante, que contiene ADN a un tubo nuevo de 1.5ml previamente rotulado. El pellet formado en el fondo del tubo contiene proteínas y es descartado.

Precipitación de ADN

1. Añadir 300µl de Isopropanol frío (-20°C) a la solución con ADN, mezclar el contenido invirtiendo el tubo varias veces.

2. Centrifugar a una velocidad de 13000 rpm durante 10 minutos.
3. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado para no perder el pellet, que en este caso contiene el ADN.
4. Añadir 300µl de etanol 70% e invertir varias veces el tubo para lavar el pellet de ADN.
5. Centrifugar a una velocidad de 13000 rpm durante 10 minutos.
6. Descartar una vez más el sobrenadante.
7. Para evitar los residuos de etanol en el tubo, dejarlo con la tapa abierta durante una hora aproximadamente de manera que se evapore, teniendo cuidado de que el pellet no se deshidrate demasiado.

Hidratación de ADN y almacenamiento

1. Añadir 50µl de 10mM TrisCl, pH 8.0 al pellet y mezclar. Resuspender el ADN dando golpes suaves a la base del tubo.
2. Almacenar hasta el día siguiente a -20°C.

Anexo 3. Protocolos de amplificación de los genes mitocondriales 12S, ND1 y CO1 utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Gen	Protocolo
12S	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	5 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	22 ciclos: 30s 94 °C, 30s 50 °C, 1 min 72 °C;
	1 ciclo: 5 min 72 °C, ∞ 4 °C
ND1	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	9 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	30 ciclos: 30s 94 °C, 30s 50 °C, 1min 72 °C;
	1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C
1era parte	1 ciclo: 2 min 94 °C, 30s 50 °C, 1min 72 °C;
	5 ciclos: 30s 94 °C, 30s 50 °C, 1min 72 °C;
	24 ciclos: 30s 94 °C, 30s 58 °C, 1min 72 °C;
	1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C
ND1	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	9 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	30 ciclos: 30s 94 °C, 30s 50 °C, 1min 72 °C;
	1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C
2da parte	1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	10 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;
	22 ciclos: 30s 94 °C, 30s 48 °C, 1min 72 °C;
	1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C

1 ciclo: 5min 95 °C;

34 ciclos: 30s 95 °C, 30s 50 °C, 45s 72 °C;

CO1 1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C

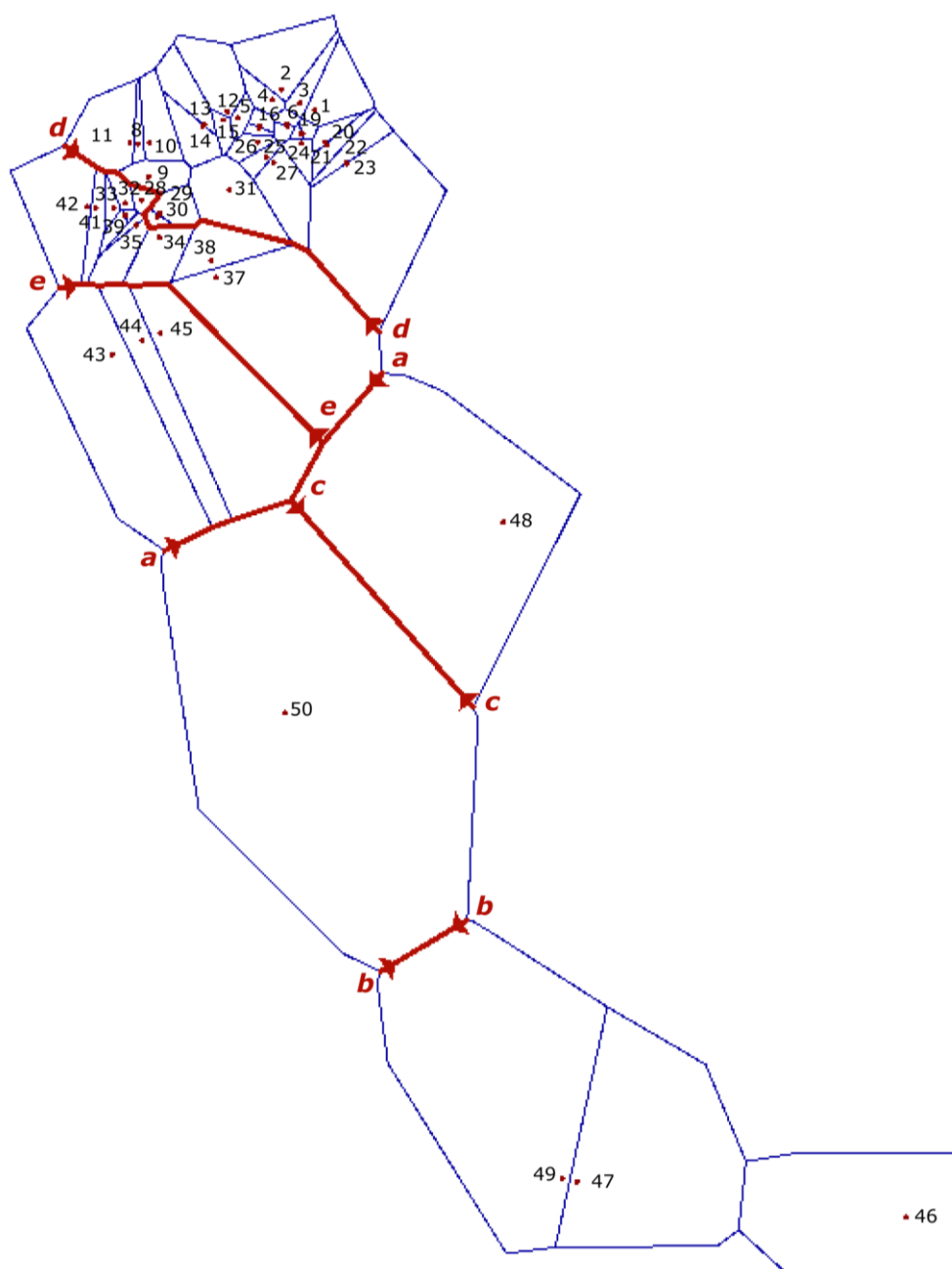
1 ciclo: 2min 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;

10 ciclos: 30s 94 °C, 30s 42 °C, 1min 72 °C;

22 ciclos: 30s 94 °C, 30s 48 °C, 1min 72 °C;

1 ciclo: 5min 72 °C, ∞ 4 °C

Anexo 4. Barreras de discontinuidades genéticas identificadas por el algoritmo de Monmonier en el programa Barrier v2.2. Las líneas azules representan la conexión entre localidades por la triangulación de Delaunay. Las líneas rojas representan las barreras genéticas que están nombradas de mayor a menor (*a–e*) de acuerdo a la magnitud de las distancias genéticas. Los números en cada punto corresponden al nombre de las localidades en el Anexo 5.



Anexo 5. Lista de localidades utilizadas para el análisis de discontinuidades genéticas en el programa Barrier v2.2. Se muestra el número QCAZ, la localidad, coordenadas geográficas y el número de cada localidad que se muestra en el Anexo 4.

No.	QCAZ	País	Localidad	Latitud	Longitud
1	27983	Ecuador	Zábalo	-0.318133	-75.766250
2	28247	Ecuador	Puerto Bolívar	-0.088600	-76.142033
3	28269	Ecuador	Playas de Cuyabeno	-0.241517	-75.930533
4	28302	Ecuador	Rey de los Andes	-0.208222	-76.236861
5	43074	Ecuador	Reserva Limoncocha	-0.406240	-76.619480
6	44140	Ecuador	Pañacocha, Banco norte	-0.471200	-76.066700
7	47736	Ecuador	La Selva	-0.498167	-76.373833
8	17942	Ecuador	Río Hollín	-0.695833	-77.730278
9	18177	Ecuador	Jatun Sacha	-1.065050	-77.614183
10	48929	Ecuador	Sumaco	-0.686590	-77.601330
11	51802	Ecuador	Vía Archidona	-0.691040	-77.820860
12	37692	Ecuador	Yanakinka norte	-0.337359	-76.738561
13	43679	Ecuador	Coca, Banco norte	-0.477820	-76.989820
14	43775	Ecuador	Coca, Banco sur	-0.498950	-77.007550
15	43892	Ecuador	Primavera, Banco norte	-0.431000	-76.786480
16	43969	Ecuador	Ñangu, Banco sur	-0.524920	-76.384450
17	44227	Ecuador	Edén, Banco sur	-0.498330	-76.071120
18	44355	Ecuador	Chiroisla, Banco sur	-0.579970	-75.917690
19	44440	Ecuador	Chiroisla, Banco norte	-0.575650	-75.899828

Anexo 5. Continuación.

No.	QCAZ	País	Localidad	Latitud	Longitud
20	44492	Ecuador	San Vicente, Banco norte	-0.679010	-75.651120
21	44599	Ecuador	Huiririma, Banco sur	-0.711630	-75.623950
22	44734	Ecuador	Santa Teresita, Banco norte	-0.900870	-75.413570
23	44775	Ecuador	Nuevo Rocafuerte, Banco sur	-0.919270	-75.401030
24	31267	Ecuador	PNY, Pozo SPF, a 8 km del Pozo	-0.691577	-75.919596
25	43066	Ecuador	PNY, km 80–75 vía Pompeya-Iro	-0.840118	-76.302406
26	51229	Ecuador	PNY, ECY, PUCE	-0.674370	-76.397050
27	51195	Ecuador	PNY, km 96 vía Pompeya-Iro	-0.906500	-76.221410
28	38332	Ecuador	Arajuno	-1.324330	-77.689000
29	38676	Ecuador	Villano	-1.470618	-77.486877
30	38948	Ecuador	Kurintza	-1.507770	-77.511660
31	39515	Ecuador	Cononaco	-1.208330	-76.716660
32	49314	Ecuador	Zanjarajuno	-1.357222	-77.870556
33	49334	Ecuador	Fátima	-1.411389	-78.000000
34	52751	Ecuador	Sarayaku	-1.735500	-77.490180
35	52816	Ecuador	Canelos	-1.606550	-77.753630
36	52837	Ecuador	Vía Canelos-Puyo	-1.601620	-77.757640
37	52892	Ecuador	Killu Allpa	-2.187117	-76.857681
38	53161	Ecuador	Montalvo	-1.992436	-76.916838

Anexo 5. Continuación.

No.	QCAZ	País	Localidad	Latitud	Longitud
39	32491	Ecuador	Bobonaza	-1.498099	-77.879310
40	32543	Ecuador	Vía Tukulí	-1.494543	-77.869654
41	52023	Ecuador	Río Negro	-1.412520	-78.204250
42	52017	Ecuador	Río Verde	-1.400140	-78.300630
43	52540	Ecuador	Santiago	-3.046550	-78.015560
44	52617	Ecuador	Puerto Morona	-2.888610	-77.681570
45	53266	Ecuador	Tukupi	-2.800453	-77.481811
46	50954	Perú	Tambopata	-12.653728	-69.179575
47	50962	Perú	Requena	-4.908022	-73.666859
48	50956	Perú	La Convención, KP 59	-12.258083	-72.842472
49	50967	Perú	La Convención, KP 55	-12.222249	-73.008579
50	50973	Perú	Picota	-7.037472	-76.090028

Anexo 6. Descripción de las cuencas hidrográficas. Se muestra la extensión, el rango altitudinal y la distribución geográfica.

Cuenca hidrográfica	Extensión (km²)	Rango altitudinal (msnm)	Distribución geográfica
Napo	59 581	200–5877	Cordillera Oriental, Zona Subandina, Cuenca Oriental
Pastaza	23 184	230–5677	Cordillera Oriental, Zona Subandina, Cuenca Oriental
Tigre	9149	200–500	Cuenca Oriental
Morona	6589	200–1300	Zona Subandina, Cuenca Oriental
Santiago	24 957	250–7319	Cordillera Oriental, Zona Subandina, Cuenca Oriental

Anexo 7. Lista de haplotipos para el gen 12S empleados en la red de haplotipos. Se muestran los individuos para cada haplotipo y sus respectivas localidades.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
1	15424, 49334, 32491, 32543, 32555, 49314, 52017, 52019, 52021, 52752, 52753, 52755, 52816, 52820, 52837, 52838, 52892, 53161, 53166, 53182, 53183	Fátima, Bobonaza, Tuculí, Zanjara-juno, Río Verde, Río Negro, Sarayaku, Canelos, Vía Canelos, Killu Allpa, Montalvo
2	17942, 38948, 51802, 51807	Río Hollín, Kurintza, Vía Archidona
3	18177, 31267, 43066, 43067, 43969, 51195	Jatun Sacha, Pozo SPF, Km 80 Pompeya-Iro, Áñangu S, Km 96 Pompeya-Iro
4	18184, 22208, 39515, 48930, 49340, 51803	Jatun Sacha, Río Hollín, Cononaco, Sumaco, Zanjara-juno, Vía Archidona
5	24425, 24427, 51949, 52018, 52023, 52024, 52026, 52028	Río Verde, Río Negro
6	27983	Zábalo
7	27995, 28003, 28269, 28302, 28455, 37692, 43074, 43103, 43140, 43679, 43680, 43775, 43892, 43968, 44227, 44228, 44229, 44355, 44356, 44357, 44440, 44441, 44442, 44492, 44493, 44494, 44599, 44600, 44601, 44734, 44735, 44736, 44775, 44776, 44778, 44915, 47736, 51075, 51229, 51230	Zábalo, Cuyabeno, Rey de los Andes, Yanakinka N, Limoncocha, Coca N, Coca S, Primavera N, Áñangu S, Edén S, Chiroisla S, Chiroisla N, San Vicente N, Huiririma S, Santa Teresita N, Rocafuerte S, La Selva, ECY
8	28247, 28249	Puerto Bolívar
9	28399	Cuyabeno
10	28492	Rey de los Andes
11	35720	ECY
12	38332	Arajuno
13	38676	Villano
14	43704	Coca N

Anexo 7. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
15	44055, 44140	La Selva, Pañacocha N
16	48919, 48929, 48931	Sumaco
17	52535, 52540, 52541, 52542, 52572	Santiago
18	52617, 52618, 52619, 53266	Puerto Morona, Tukupi
19	52751	Sarayaku
20	53165, 53167, 53184	Montalvo
21	53294	Tukupi
22	50954, 50967	Tambopata, La Convención KP 55
23	50956	La Convención KP 59
24	50962	Requena
25	50973	Picota

Anexo 8. Lista de haplotipos para el gen ND1 empleados en la red de haplotipos. Se muestran los individuos para cada haplotipo y sus respectivas localidades.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
1	15424, 24425, 24427, 32543, 32555, 38332, 51949, 52018, 52023, 52816, 52820, 52837	Fátima, Río Verde, Tuculí, Arajuno, Río Negro, Canelos, Vía Canelos
2	17942, 51802, 51807	Río Hollín, Vía Archidona
3	18177	Jatun Sacha
4	22208	Río Hollín
5	27983	Zábalo
6	27995	Zábalo
7	28003	Zábalo
8	28247	Puerto Bolívar
9	28249	Puerto Bolívar
10	28269	Cuyabeno
11	28302	Rey de los Andes
12	28399	Cuyabeno
13	28455	Rey de los Andes
14	28492	Rey de los Andes
15	31267	Pozo SPF
16	32491	Bobonaza
17	35720	ECY

Anexo 8. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
18	37692, 47736	Yanakinka N, La Selva
19	38676	Villano
20	38948	Kurintza
21	39515	Cononaco
22	43066, 43969, 51195	Km 80 Pompeya-Iro, Áñangu S, Km 96 Pompeya-Iro
23	43067	Km 80 Pompeya-Iro
24	43074	Limoncocha
25	43103	Limoncocha
26	43140	Limoncocha
27	43679	Coca N
28	43680	Coca N
29	43704	Coca N
30	43775, 44915	Coca S, Limoncocha
31	43892	Primavera N
32	43968	Áñangu S
33	44055	La Selva
34	44140	Pañacocha N
35	44227, 44229, 44357	Edén S, Chiroisla S
36	44228	Edén S
37	44355, 44356	Chiroisla S
38	44440, 44442	Chiroisla N

Anexo 8. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
39	44441	Chiroilsa N
40	44492	San Vicente N
41	44493	San Vicente N
42	44494	San Vicente N
43	44599, 44600	Huiririma S
44	44601	Huiririma S
45	44734, 44736	Santa Teresita N
46	44735	Santa Teresita N
47	44775	Rocafuerte S
48	44776	Rocafuerte S
49	44778	Rocafuerte S
50	48919, 48929, 48931	Sumaco
51	48930	Sumaco
52	49334	Fátima
53	49340	Zanjarajuno
54	51075	ECY
55	51229, 51230	ECY
56	51803	Vía Archidona
57	52017, 52019	Río Verde
58	52021	Río Negro
59	52026	Río Negro
60	52540, 52541	Santiago

Anexo 8. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
61	52542, 52572	Santiago
62	52617, 52619	Puerto Morona
63	52751	Sarayaku
64	52752	Sarayaku
65	52755	Sarayaku
66	52838	Vía Canelos
67	52892	Killu Allpa
68	53161	Montalvo
69	53165, 53167, 53184	Montalvo
70	53166	Montalvo
71	53181, 53182	Montalvo
72	53183	Montalvo
73	53266	Tukupi
74	53294	Tukupi
75	50954	Tambopata
76	50956	La Convención KP 59
77	50962	Requena
78	50973	Picota

Anexo 9. Lista de haplotipos para el gen CO1 empleados en la red de haplotipos. Se muestran los individuos para cada haplotipo y sus respectivas localidades.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
1	15424, 49314	Fátima, Zanjarauno
2	17942, 51802, 51807	Río Hollín, Vía Archidona
3	18177, 51803	Jatun Sacha, Vía Archidona
4	22208, 28003, 28247, 28249, 28269, 28399, 28455, 28492, 38948, 39515, 43066, 43067, 43074, 43140, 43680, 43892, 43968, 43969, 44055, 44140, 44599, 44600, 44601, 44734 44736, 44775, 44776, 44778, 47736, 51195, 51229, 51230	Río Hollín, Zábalo, Puerto Bolívar, Cuyabeno, Rey de los Andes, Kurintza, Cononaco, Km 80 Pommpeya-Iro, Limoncocha, Coca N, Primavera N, Áñangu S, La Selva, Pañacocha N, Huiririma S, Santa Teresita N, Rocafuerte S, Km 96 Pompeya-Iro, ECU
5	24425, 24427, 32543, 32555, 38332, 49334, 51949, 52018, 52021, 52023, 52024, 52026, 52028, 52816, 52837, 52838	Río Verde, Tuculí, Arajuno, Fátima, Río Negro, Río Verde, Canelos, Vía Canelos
6	27983	Zábalo
7	27995, 28302, 43704	Zábalo, Rey de los Andes, Coca N
8	31267	Pozo SPF
9	32491, 52017, 52019	Bobonaza, Río Verde
10	35720	ECU

Anexo 9. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
11	37692	Yanakinka N
12	38676	Villano
13	43103, 51075	Limoncocha, EY
14	43679	Coca N
15	43775	Coca S
16	44227, 44229	Edén S
17	44228	Edén S
18	44355, 44356, 44440, 44441, 44442, 44492	Chiroisla N, Chiroisla S, San Vicente N
19	44357	Chiroisla S
20	44493	San Vicente N
21	44494	San Vicente N
22	44735	Santa Teresita N
23	44915	Limoncocha
24	48919, 48929, 48931	Sumaco
25	48930	Sumaco
26	49340	Zanjarajuno
27	52535, 52540, 52541, 52542, 52572	Santiago
28	52617, 53266	Puerto Morona, Tukupi
29	52618	Puerto Morona
30	52619	Puerto Morona
31	52751, 52755	Sarayaku
32	52752, 52892, 53165, 53166, 53167, 53183, 53184	Sarayaku, Killu Allpa, Montalvo

Anexo 9. Continuación.

No.	Individuos QCAZ	Localidades
haplotipo		
33	52753	Sarayaku
34	52820	Canelos
35	53161	Montalvo
36	53181, 53182	Montalvo
37	53294	Tukupi
38	50954	Tambopata
39	50956	La Convención KP 59
40	50962	Requena
41	50967	La Convención KP 55
42	50973	Picota

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Carlos Daniel Rivadeneira Montenegro, C.I. 1720790532, autor del trabajo de graduación intitulado “Sistemática y filogeografía de *Dendropsophus parviceps* (Anura: Hylidae) en la Cuenca Amazónica”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetado los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 28 de Abril del 2014

Sr. Carlos Daniel Rivadeneira Montenegro

C.I. 1720790532

